



УДК 616-006.484

# ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КЛЕТОК ГЛИОБЛАСТОМЫ НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ

© 2025 г. А. И. Резекина\*, Д. В. Мазур\*, М. И. Шахпаронов\*, Н. В. Антипова\*, \*\*, #

\* ФГБУН ГНЦ “Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова” РАН, Россия, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

\*\* Национальный исследовательский университет “Высшая школа экономики”, Россия, 101000 Москва, ул. Мясницкая, 20

Поступила в редакцию 13.05.2025 г.

После доработки 23.05.2025 г.

Принята к публикации 24.05.2025 г.

Клеточная гетерогенность – черта глиобластомы, злокачественной и агрессивной опухоли головного мозга, и одна из причин неэффективности стандартных методов лечения, вероятно, возникающая из-за дифференцировки опухолевых стволовых клеток. Причины повышенных адаптивных способностей и устойчивости клеток глиобластомы к лекарственным препаратам и стрессу заложены на уровне молекулярных процессов. По этой причине в данной работе с помощью ПЦР в реальном времени была проведена оценка изменения экспрессии генов транскрипционных факторов *MYCN*, *MYCC*, *RHOX2A* и *RHOX2B*, задействованных в регуляции клеточного цикла и дифференцировки, в ответ на изменение условий культивирования. В результате работы было показано, что в среде с эмбриональной бычьей сывороткой первичные культуры по экспрессии генов и морфологии клеток становятся похожи на клеточные линии. Кроме того, впервые было показано, что все клеточные линии и первичные культуры глиобластомы отличаются профилями экспрессии исследованных генов, однако в ответ на изменение условий культивирования для всех свойственно многократное увеличение экспрессии *MYCN*, а также противоположный ответ *RHOX2A* и *RHOX2B*, что указывает на возможную роль этих генов в устойчивости глиобластомы к стрессу. Полученные данные стоит учитывать при подборе индивидуального лечения для пациентов, а также при разработке терапевтических агентов и дальнейшем исследовании молекулярных процессов в клетках глиобластомы.

**Ключевые слова:** глиобластома, *MYCN*, *MYCC*, *RHOX2A*, *RHOX2B*

**DOI:** 10.31857/S0132342325050181

## ВВЕДЕНИЕ

Глиобластома (GBM) – агрессивная опухоль головного мозга, для которой характерны высокая гетерогенность, быстрая пролиферация, инфильтрация в здоровые ткани и гибкая регуляция метаболизма. Средняя общая выживаемость пациентов, проходящих лечение, составляет ~14–15 месяцев [1, 2], а устойчивость к препаратам может развиваться после начала лечения или даже быть чертой некоторых опухолей [3], поэтому детальное изучение данной патологии и поиск новых терапевти-

ческих подходов – важная и актуальная задача на сегодняшний день.

На основании транскриптомного анализа клетки GBM классифицируют на три подтипа: proneuronal, mesenchymal и classical [4]. Клетки этих подтипов отличаются чертами экспрессии генов, разной чувствительностью к терапии [4] и особенностями метаболизма [5]. Более того, как основной механизм устойчивости опухоли к радио- и химиотерапии рассматривается proneural-mesenchymal переход – переключение экспрессии генов, в результате которого клетки

Сокращения: bFGF – основной фактор роста фибробластов; EGF – эпидермальный фактор роста; FBS – эмбриональная бычья сыворотка; GBM – глиобластома.

# Автор для связи: (тел.: +7 (977) 773-22-07; эл. почта: nadine.antipova@gmail.com).

пронейронального подтипа теряют свои характеристики и приобретают свойства более агрессивного мезенхимального подтипа [6, 7]. С учетом пластичности клеток GBM важно проводить поиск особенностей всех типов клеток для разработки эффективного метода лечения.

Возникновение нескольких подтипов клеток в глиобластоме, т.е. клеточной гетерогенности, часто связывают с опухолевыми стволовыми клетками, малодифференцированной популяцией клеток, способных к непрерывной пролиферации и генерации фенотипически отличных клеток [8–10]. Они экспрессируют специфические гены-маркеры, благодаря которым их отличают от неопухолевых стромальных клеток и также подразделяют на пронейрональный и мезенхимальный подтипы. Для первого подтипа характерна экспрессия генов *CD133*, *CD15*, *DLL3*, *MAP2*, *SOX2*, *OLIG2*, в то время как для второго – генов *CD109*, *CD44*, *ALDH1A3*, *EGFR*, *YKL40*, *BM1*, *GFAP* и прочих [7, 11, 12]. Для опухолевых стволовых клеток характерна особая регуляция генов, благодаря которой они способны пережить терапию и привести к развитию рецидива [13], поэтому причины исключительной агрессивности и устойчивости к лекарственным препаратам глиобластомы также стоит искать среди особенностей экспрессии генов в клетках этой опухоли.

Так, для глиобластомы часто характерна сверхэкспрессия генов транскрипционных факторов из семейства MYC: *MYCN* и *MYCC* [14, 15]. Они играют важную роль в контроле клеточного цикла, метаболизма клеток и выживаемости опухолевых стволовых клеток [16], а их дерегуляция приводит к прогрессированию опухолей головного мозга [17, 18].

*RHOX2A* и его паралог *RHOX2B* – это два гомеодоменных фактора транскрипции, которые играют ключевую роль в развитии вегетативной нервной системы и дифференциации нейронов, а

также вовлечены в остановку клеточного цикла [19–22]. Эти гены обычно сверхэкспрессированы в клетках нейробластомы и, как предполагается, задействованы в патогенезе этого типа опухоли [23]. Также есть сведения о том, что в нейробластоме повышенная экспрессия *MYCN* способствует активации транскрипции *RHOX2B* [24]. Данные касательно роли этих генов в клетках глиобластомы немногочисленны, однако исследование особенностей экспрессии ключевых транскрипционных факторов, а также механизмов дифференцировки опухолевых стволовых клеток способно помочь в поиске молекулярных путей, важных для терапии глиобластомы и повышения чувствительности опухолевых клеток к лекарственным препаратам.

Целью данной работы была оценка изменения экспрессии генов маркеров опухолевых стволовых клеток глиобластомы и транскрипционных факторов *MYCN*, *MYCC*, *RHOX2A* и *RHOX2B*, задействованных в регуляции клеточного цикла и дифференцировки, в ответ на изменение условий культивирования клеточных линий и первичных культур глиобластомы.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе эксперимента необходимо было установить уровень экспрессии транскрипционных факторов в типичных (нативных) условиях культивирования клеточных линий и первичных культур, а затем проследить за тем, что произойдет, если изменить состав среды (рис. 1) – культивировать первичные культуры на среде с 10% эмбриональной бычьей сыворотки (FBS), а клеточные линии – на среде с ростовыми факторами EGF и bFGF (эпидермальный и основной фактор роста фибробластов соответственно) и добавкой для обеспечения жизнеспособности нейронов NCS-21.

При помощи ПЦР в реальном времени было определено, что гены транскрипционных факто-

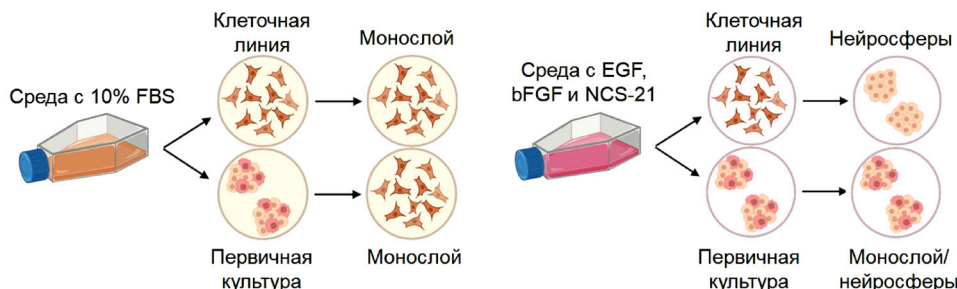
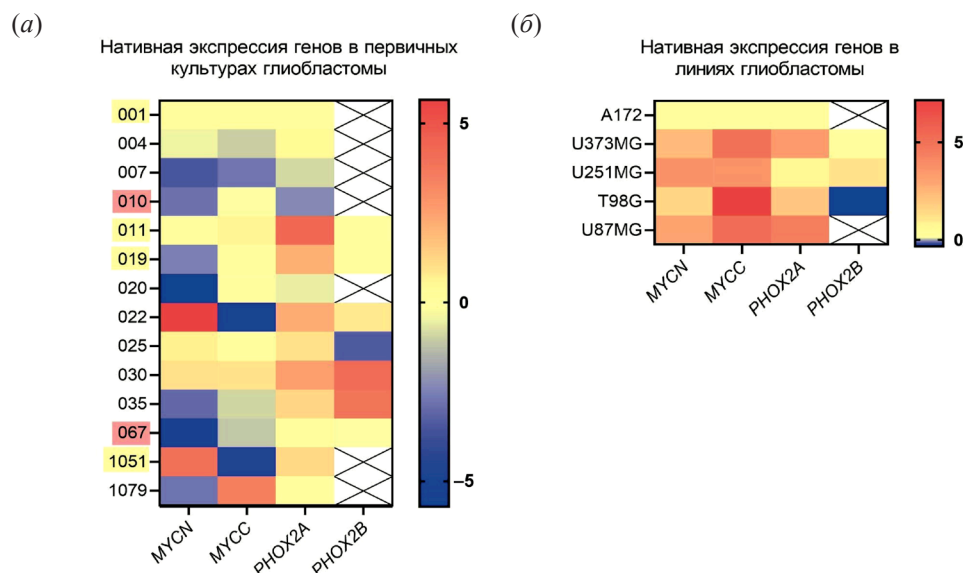


Рис. 1. Дизайн эксперимента с изменением условий культивирования клеток GBM (создан при помощи [www.biorender.com](http://www.biorender.com)).

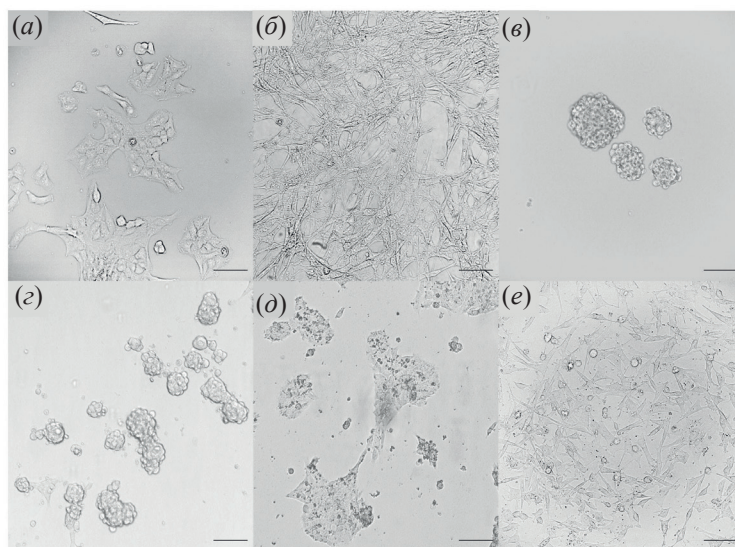
ров *MYCN*, *MYCC*, *PNOX2A* и *PNOX2B* экспрессируются дифференциально в нативных условиях в клетках глиобластомы (рис. 2). Можно отметить, что первичные культуры с пронеурональным подтипом (001, 011, 019, 1051) продемонстрировали более высокий уровень экспрессии *PNOX2A*, чем опухоли с мезенхимальным подтипом (010, 067). Часто экспрессия *PNOX2B* не детектировалась. Каждая клеточная культура обладала уни-

кальным профилем экспрессии исследуемых генов, что подтверждает высокую гетерогенность GBM.

Во время культивирования клеточных линий в среде с EGF, bFGF и NCS-21 и первичных культур в среде с 10% FBS морфология клеток GBM изменилась (рис. 3). T98G и U251MG, в стандартных условиях образующие монослой, в бессывороточной среде формировали нейросферы;



**Рис. 2.** Тепловая карта, показывающая дифференциальную нативную экспрессию генов транскрипционных факторов в первичных культурах GBM (a) и в клеточных линиях GBM (б). Номера первичных культур с мезенхимальным подтипом выделены красным, с пронеурональным – желтым. Приведены значения  $\log_2$  от средних значений  $2^{-ddCt}$ . Белая клетка с крестом – экспрессия не детектирована прибором.

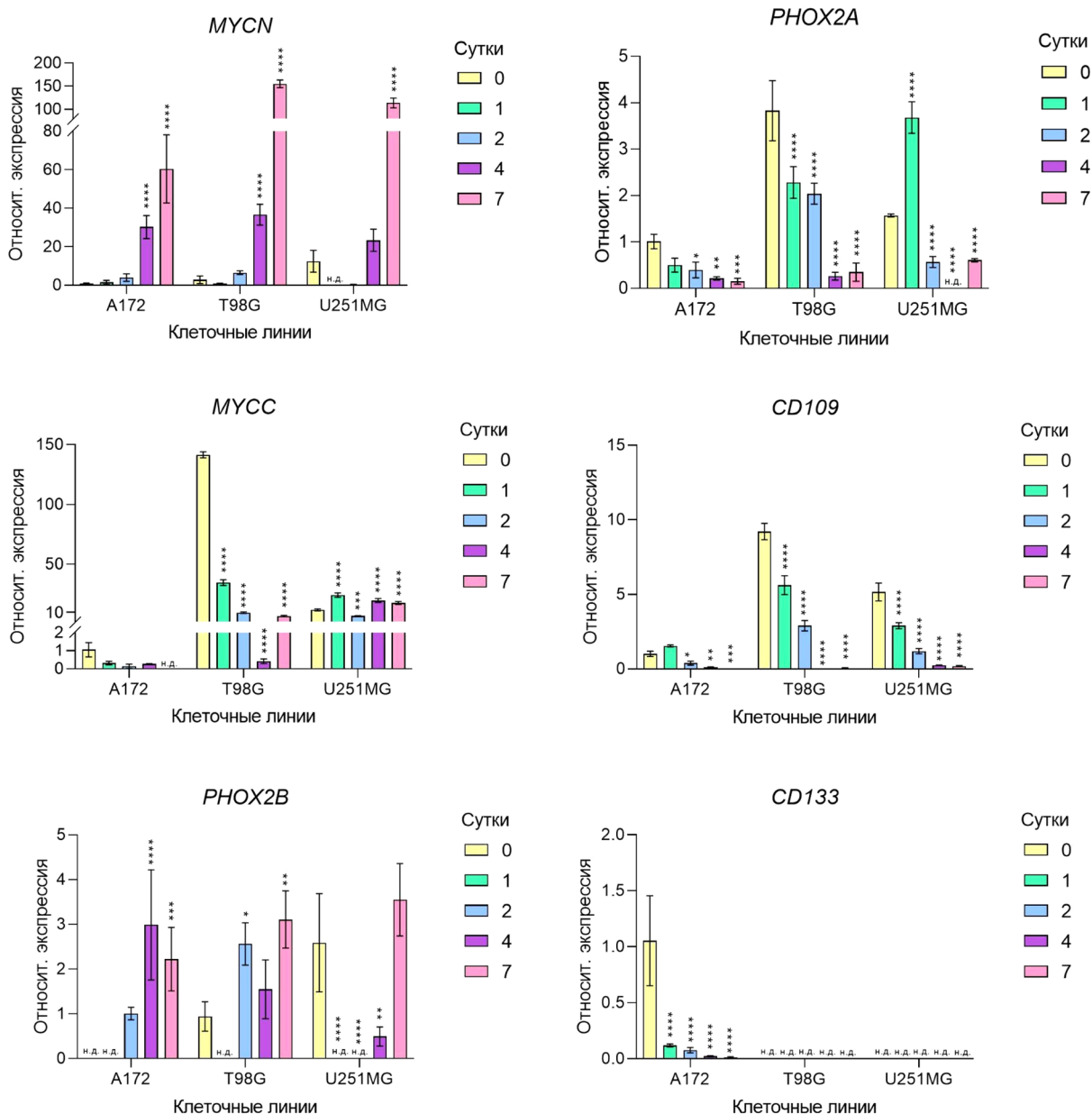


**Рис. 3.** Морфология клеток глиобластомы после изменения условий культивирования. (a) – T98G в среде с сывороткой; (б) – A172 в среде с сывороткой; (в) – 019 в среде с EGF, bFGF и NCS-21; (г) – T98G в среде с EGF, bFGF и NCS-21; (д) – A172 в среде с EGF, bFGF и NCS-21; (е) – 019 в среде с сывороткой. Масштабный отрезок – 100 мкм.

035 и A172 так же, как обычно, формировали монослой, однако в новых условиях клетки изменили форму, стали более плоскими и широкими. Клетки первичных линий 011 и 019, обычно культивируемые в виде нейросфер, в среде с FBS, наоборот, росли в виде моно слоя.

В ответ на новые условия культивирования постепенно изменялась и экспрессия генов. В бессывороточной среде с факторами роста в клеточных линиях GBM со временем значительно

увеличилась экспрессия *MYCN* (в 50–150 раз), немного повысилась экспрессия *PHOX2B* (до 3 раз), снизилась экспрессия *PHOX2A* (в 2.5–10 раз) и *MYCC* (в двух из трех линий, до 20 раз) (рис. 4). Часто гены *PHOX2A* и *PHOX2B* действуют синергично [19], повышение экспрессии обоих приводит к дифференцировке нейронов, нокаун – к остановке клеточного цикла [21, 22]. В измененных условиях, наоборот, не наблюдалось согласованного ответа этих генов, что может быть связано



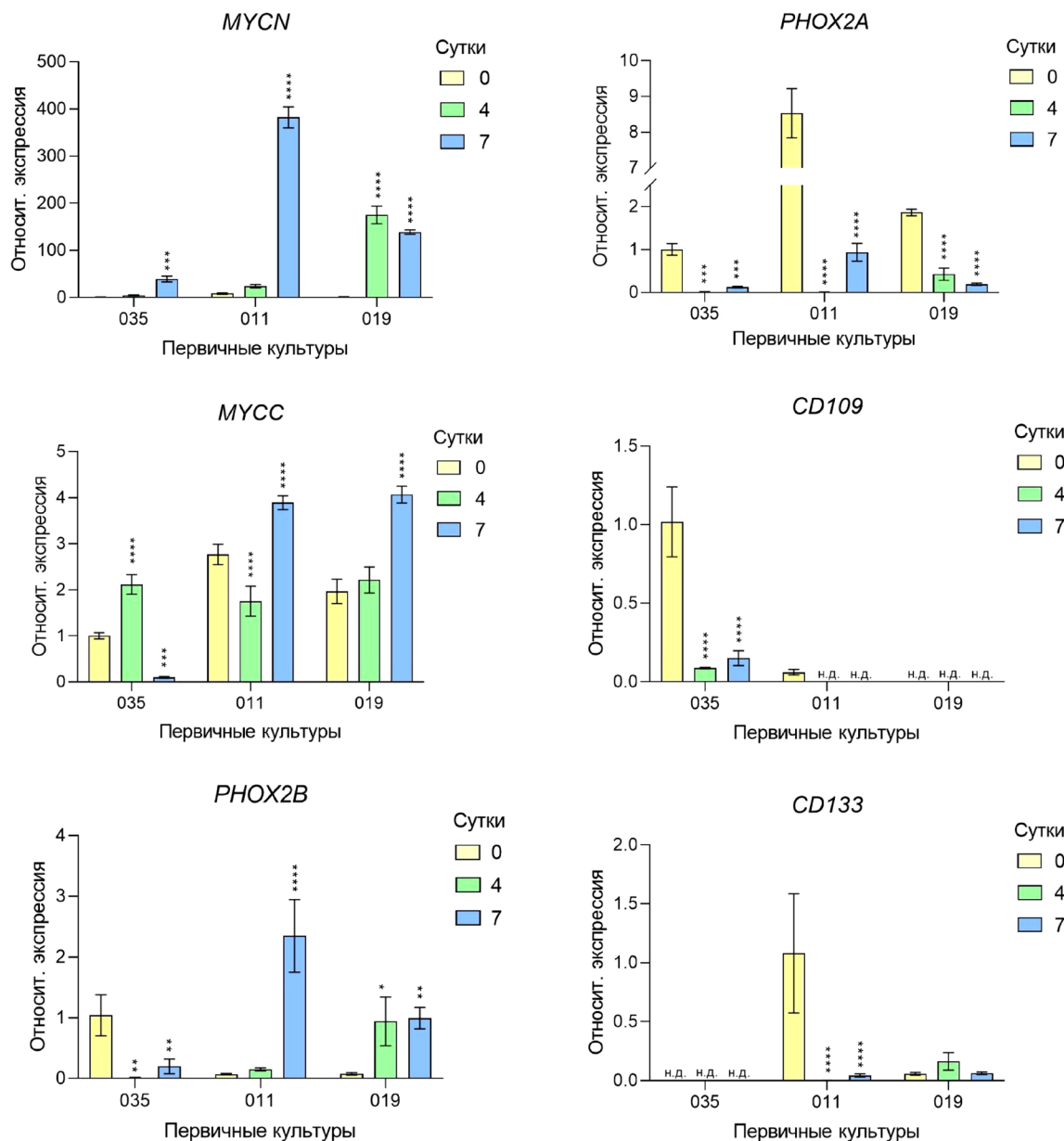
**Рис. 4.** Относительная экспрессия генов транскрипционных факторов и маркеров стволовых клеток глиобластомы в клеточных линиях GBM при культивировании в среде с EGF, bFGF и добавкой NCS-21 в течение 1, 2, 4 и 7 суток. Приведены средние значения  $2^{-ddCt}$  и стандартные отклонения трех независимых измерений. “Н.д.” – экспрессия не детектирована прибором. \*  $p \leq 0.05$ ; \*\*  $p \leq 0.01$ ; \*\*\*  $p \leq 0.001$ ; \*\*\*\*  $p \leq 0.0001$ .



с разной ролью этих генов в молекулярных каскадах, важных для ответа клеток GBM на стресс. Кроме того, нокдаун *MYCC* также ассоциирован со снижением пролиферации и остановкой клеточного цикла [16]. Таким образом, снижение его экспрессии вслед за резким снижением количества питательных веществ может быть также связано со стрессом, претерпеваемым клетками GBM. Следует отметить, что в стандартных клеточных линиях, характеризующихся низкой или отсут-

ствующей стволовостью, все равно экспрессировались маркеры мезенхимальных (*CD109*) и пронейрональных (*CD133*) стволовых клеток GBM, и их экспрессия уменьшалась при культивировании в бессывороточных условиях.

Интересно то, что в среде с FBS в клетках первичных культур происходили аналогичные изменения. Экспрессия *MYCN* также возросла (в 40–380 раз), а экспрессия *RHOX2A* снизилась (в 8–9 раз) (рис. 5). Уровни экспрессии *MYCC* и



**Рис. 5.** Относительная экспрессия генов транскрипционных факторов и маркеров стволовых клеток глиобластомы в первичных культурах GBM при культивировании в среде с 10% FBS в течение 4 и 7 суток. Приведены средние значения  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  и стандартные отклонения трех независимых измерений. \*  $p \leq 0.05$ ; \*\*  $p \leq 0.01$ ; \*\*\*  $p \leq 0.001$ ; \*\*\*\*  $p \leq 0.0001$ .

*PHOX2B* в культуре 035 снизились (в 10 и 5 раз соответственно), однако в культурах с пронейрональным подтипом, наоборот, повысились (в 1.5–2 и 15–30 раз). Экспрессия *CD133* и *CD109* также со временем уменьшилась, что согласуется с фактом, что в среде с FBS опухолевые стволовые клетки подвергаются дифференцировке, и первичные культуры приобретают морфологию гомогенных линий, а также теряют свои маркеры, онкогенный потенциал и способность к самообновлению [25]. Через 7 суток культивирования первичных культур в среде с FBS уровни экспрессии *MYCC*, *PHOX2A* и *PHOX2B* также стали ближе к профилям экспрессии клеточных линий. Однако экспрессия *MYCN* существенно повышалась в ответ на изменение условий культивирования и клеточных линий, и первичных культур, что может быть связано с регуляторной ролью этого гена в защите опухолевых клеток от стресса [26].

#### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

##### Культуры клетки и условия культивирования.

Клеточные линии GBM культивировали при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> в среде DMEM/F12 (Elabscience, США) с 2 mM L-глутамина, 10% FBS (Capricorn, Германия) и 1% пенициллина-стрептомицина (ПанЭко, Россия). Первичные клеточные культуры также культивировали при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, но в среде DMEM/F12 с 2 mM L-глутамина, 20 нг/мл эпидермального фактора роста (EGF) (Sigma-Aldrich, США), 20 нг/мл основного фактора роста фибробластов (bFGF) (СайСторЛаб, Россия), 2% добавки для обеспечения жизнеспособности

нейронов НейроМакс (NCS-21) (ПанЭко, Россия) и 1% пенициллина-стрептомицина. Также для эксперимента среды культивирования меняли: к клеточным линиям добавляли среду с EGF, bFGF и NCS-21, а к первичным культурам – с 10% FBS.

В данной работе использовали клеточные линии глиобластомы A172, T98G, U87MG, U251MG и U373MG из Американской коллекции типовых культур, а также первичные культуры, полученные от пациентов: опухоли 001, 011, 019 и 1051 обладали пронейрональным подтипом, а опухоли 010 и 067 – мезенхимальным, подтип остальных не был однозначно определен из-за высокой гетерогенности образцов.

**Экспрессия генов.** После окончания инкубации клетки лизировали с помощью реагента ExtractRNA (Евроген, Россия) и выделяли тотальную РНК фенол-хлороформным методом. Концентрацию РНК определяли с использованием спектрофотометра Nanodrop One C (Thermo Fisher Scientific, США). Для обратной транскрипции использовали тотальную РНК и набор MMLV RT (Евроген, Россия). ПЦР в реальном времени проводили на приборе LightCycler 96 (Roche, Швейцария) с использованием реагента qPCRmix-NS SYBR (Евроген, Россия): 95°C – 150 с, затем 45 циклов: 95°C – 20 с, 60°C – 20 с, 72°C – 20 с. Результаты анализировали с помощью программного обеспечения LightCycler Software (версия 4.1, Roche). Для каждой пары праймеров (табл. 1) регистрировали пики плавления ПЦР в трех повторях. Полученные значения Ct (cycle threshold)

**Таблица 1.** Последовательности олигонуклеотидов для ПЦР-амплификации

Ген	Последовательности олигонуклеотидов (5'–3')
<i>MYCC</i>	F: CACCGAGTCGTAGTCGAGGT R: TTTCGGGTAGTGGAAAACCA
<i>MYCN</i>	F: GAGGACACCCTGAGCGATTC R: TTGGTGTGGAGGAGGAACG
<i>PHOX2A</i>	F: CTTCCAATACAGCCCCCTGC R: TGCACGCGAGCCTCAG
<i>PHOX2B</i>	F: ATTCCTCTGCCTACGAGTCCT R: TTTGTAAGGAAGTGC GGCG
<i>CD109</i>	F: CATCAAACCTCACTGTCTCTGTC R: CTGGGTACGTCCGGTTACAC
<i>CD133</i>	F: ACTCCCATAAAGCTGGACCC R: TCAATTTTGGATTCAATGCTT
<i>18S рДНК</i>	F: GGCCCTGTAATTGGAATGAGTC R: CCAAGATCCAACCTACGAGCTT

для каждого образца не превышали 35. Изменения оценивали относительно амплификации 18S рРНК. Все результаты относительно контроля были значимы при  $p \leq 0.05$  (однофакторный дисперсионный анализ).

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Клеточные линии и первичные культуры глиобластомы обладают уникальными профилями экспрессии генов *MYCN*, *MYCC*, *RHOX2A*, *RHOX2B* и, несмотря на это, схожим образом реагируют на изменение условий культивирования: наблюдается значительное увеличение экспрессии *MYCN* и постепенное снижение экспрессии *RHOX2A*. На среде с эмбриональной бычьей сывороткой клетки первичных культур глиобластомы приобретают морфологию, свойственную клеточным линиям, что сопровождается уменьшением экспрессии маркеров опухолевых стволовых клеток глиобластомы и приближением экспрессии транскрипционных факторов к их уровню в клеточных линиях.

Таким образом, в новых условиях происходит отдаление от первоначальных молекулярных параметров опухоли в сторону менее точных *in vitro* моделей глиобластомы – клеточных линий. Более того, многократное увеличение экспрессии *MYCN*, а также противоположный ответ *RHOX2A* и *RHOX2B* на изменение условий культивирования указывают на возможную роль этих генов в устойчивости глиобластомы к стрессу, что делает их важным объектом для дальнейших исследований с целью поиска терапевтических мишеней для глиобластомы.

### ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена в рамках гранта Российского научного фонда № 24-15-00097: “Идентификация генов – потенциальных мишеней терапии нейрогенных опухолей”.

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Образцы опухолей (глиобластомы) были получены от пациентов во время хирургических вмешательств в Федеральном государственном автономном учреждении “Национальный медицинский исследовательский центр нейрохирургии имени академика Н.Н. Бурденко” Министерства здравоохранения Российской Федерации. Диагноз устанавливали на основании гистологического анализа в соответствии с классификацией опухолей

головного мозга, предложенной Всемирной организацией здравоохранения.

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального и национального комитета по исследовательской этике, а также Хельсинкской декларации 1964 года и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики.

Исследование одобрено этическим комитетом “Национального медицинского исследовательского центра нейрохирургии им. Н.Н. Бурденко”, протокол № 176 от 29 августа 2019 года. От всех пациентов было получено письменное информированное согласие на участие в исследовании.

Обработку тканей проводили в исследовательской лаборатории после деидентификации образцов.

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### ВКЛАД АВТОРОВ

Концептуализация – АНВ; экспериментальные работы – РАИ; написание статьи – РАИ, МДВ; анализ данных – РАИ; администрирование проекта – ШМИ, МДВ, АНВ.

Все авторы дали одобрение на окончательный вариант рукописи.

### ДОСТУПНОСТЬ ДАННЫХ

Данные, подтверждающие выводы настоящего исследования, можно получить у корреспондирующего автора по обоснованному запросу.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Stupp R., Mason W.P., van den Bent M.J., Weller M., Fisher B., Taphoorn M.J., Belanger K., Brandes A.A., Marosi C., Bogdahn U., Curschmann J., Janzer R.C., Ludwin S.K., Gorlia T., Allgeier A., Lacombe D., Cairncross J.G., Eisenhauer E., Mirimanoff R.O. // N. Engl. J. Med. 2005. V. 352. P. 987–996. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa043330>
2. Yersal Ö. // J. Oncol. Sci. 2017. V. 3. P. 123–126. <https://doi.org/10.1016/j.jons.2017.10.005>
3. Wick W., Platten M. // Cancer Discov. 2014. V. 4. P. 1120–1122. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-14-0918>
4. Sidaway P. // Nat. Rev. Clin. Oncol. 2017. V. 14. P. 587. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2017.122>

5. Xu C., Hou P., Li X., Xiao M., Zhang Z., Li Z., Xu J., Liu G., Tan Y., Fang C. // *Cancer Biol. Med.* 2024. V. 21. P. 363–381.  
<https://doi.org/10.20892/j.issn.2095-3941.2023.0510>
6. Fedele M., Cerchia L., Pegoraro S., Sgarra R., Manfioletti G. // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20. P. 2746.  
<https://doi.org/10.3390/ijms20112746>
7. Wang Z., Zhang H., Xu S., Liu Z., Cheng Q. // *Signal Transduct. Target. Ther.* 2021. V. 6. P. 124.  
<https://doi.org/10.1038/s41392-021-00491-w>
8. Грабовенко Ф.И., Кусиль О.В., Павлова Г.В., Зверева М.Э. // *Вопросы нейрохирургии им. Н.Н. Бурденко.* 2022. V. 86. P. 113–120.  
<https://doi.org/10.17116/neiro202286061113>
9. Dick J.E. // *Blood.* 2008. V. 112. P. 4793–4807.  
<https://doi.org/10.1182/blood-2008-08-077941>
10. Chu X., Tian W., Ning J., Xiao G., Zhou Y., Wang Z., Zhai Z., Tanzhu G., Yang J., Zhou R. // *Signal Transduct. Target. Ther.* 2024. V. 9. P. 170.  
<https://doi.org/10.1038/s41392-024-01851-y>
11. Li C., Cho H.J., Yamashita D., Abdelrashid M., Chen Q., Bastola S., Chagoya G., Elsayed G.A., Komarova S., Ozaki S., Ohtsuka Y., Kunieda T., Kornblum H.I., Kondo T., Nam D.H., Nakano I. // *Neurooncol. Adv.* 2020. V. 2. P. vdaa163.  
<https://doi.org/10.1093/oaajnl/vdaa163>
12. Behnan J., Stangeland B., Hosainey S.A., Joel M., Olsen T.K., Micci F., Glover J.C., Isakson P., Brinckmann J.E. // *Oncogene.* 2017. V. 36. P. 570–584.  
<https://doi.org/10.1038/onc.2016.230>
13. Bao S., Wu Q., McLendon R.E., Hao Y., Shi Q., Hjelmeland A.B., Dewhirst M.W., Bigner D.D., Rich J.N. // *Nature.* 2006. V. 444. P. 756–760.  
<https://doi.org/10.1038/nature05236>
14. Hui A.B., Lo K.W., Yin X.L., Poon W.S., Ng H.K. // *Lab. Invest.* 2001. V. 81. P. 717–723.  
<https://doi.org/10.1038/labinvest.3780280>
15. Hodgson J.G., Yeh R.F., Ray A., Wang N.J., Smirnov I., Yu M., Hariono S., Silber J., Feiler H.S., Gray J.W., Spellman P.T., Vandenberg S.R., Berger M.S., James C.D. // *Neuro Oncol.* 2009. V. 11. P. 477–487.  
<https://doi.org/10.1215/15228517-2008-113>
16. Wang J., Wang H., Li Z., Wu Q., Lathia J.D., McLendon R.E., Hjelmeland A.B., Rich J.N. // *PLoS One.* 2008. V. 3. P. e3769.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003769>
17. Cencioni C., Scagnoli F., Spallotta F., Nasi S., Illi B. // *Int. J. Mol. Sci.* 2023. V. 24. P. 4217.  
<https://doi.org/10.3390/ijms24044217>
18. Borgenik A., Čančer M., Hutter S., Swartling F.J. // *Front. Oncol.* 2021. V. 10. P. 626751.  
<https://doi.org/10.3389/fonc.2020.626751>
19. Pattyn A., Morin X., Cremer H., Goridis C., Brunet J.F. // *Development.* 1997. V. 124. P. 4065–4075.  
<https://doi.org/10.1242/dev.124.20.4065>
20. Morin X., Cremer H., Hirsch M.R., Kapur R.P., Goridis C., Brunet J.F. // *Neuron.* 1997. V. 18. P. 411–423.  
[https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)81242-8](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)81242-8)
21. Paris M., Wang W.H., Shin M.H., Franklin D.S., Andrisani O.M. // *Mol. Cell. Biol.* 2006. V. 26. P. 8826–8839.  
<https://doi.org/10.1128/MCB.00575-06>
22. Dubreuil V., Hirsch M.R., Pattyn A., Brunet J.F., Goridis C. // *Development.* 2000. V. 127. P. 5191–5201.  
<https://doi.org/10.1242/dev.127.23.5191>
23. Longo L., Borghini S., Schena F., Parodi S., Albino D., Bachetti T., Da Prato L., Truini M., Gambini C., Tonini G.P., Ceccherini I., Perri P. // *Int. J. Oncol.* 2008. V. 33. P. 985–991.
24. Perri P., Ponzoni M., Corrias M.V., Ceccherini I., Candiani S., Bachetti T. // *Cancers (Basel).* 2021. V. 13. P. 5528.  
<https://doi.org/10.3390/cancers13215528>
25. Lee J., Kotliarova S., Kotliarov Y., Li A., Su Q., Donin N.M., Pastorino S., Purow B.W., Christopher N., Zhang W., Park J.K., Fine H.A. // *Cancer Cell.* 2006. V. 9. P. 391–403.  
<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.03.030>
26. Müller M., Trunk K., Fleischhauer D., Büchel G. // *EJC Paediatr. Oncol.* 2024. V. 4. P. 100182.  
<https://doi.org/10.1016/j.ejcped.2024.100182>



# Influence of the Cultivation Conditions of Glioblastoma Cells on the Expression of Transcription Factors Genes

A. I. Rezekina\*, D. V. Mazur\*, M. I. Shakhparonov\*, and N. V. Antipova\*, \*\*, #

# Phone: +7 (977) 773-22-07; e-mail: nadine.antipova@gmail.com

\* Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences,  
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

\*\* National Research University “Higher School of Economics”,  
ul. Myasnitskaya 20, Moscow, 101000 Russia

Cellular heterogeneity is a feature of glioblastoma, a malignant and aggressive brain tumor, and one of the reasons for the ineffectiveness of standard treatment methods, probably arising from the differentiation of tumor stem cells. The causes of increased adaptive abilities and resistance of glioblastoma cells to drugs and stress arise at the level of molecular processes. For this reason, there were evaluated changes in the expression of the genes of transcription factors *MYCN*, *MYCC*, *PHOX2A* and *PHOX2B*, which are involved in the regulation of the cell cycle and differentiation, using real-time PCR in response to changes in cultivating conditions in this work. As a result, it was shown that primary cultures in an environment with fetal bovine serum acquire morphology and gene expression similar to cell lines. In addition, it was shown for the first time that all cell lines and primary cultures of glioblastoma differ in the expression profiles of the studied genes, however, in response to changes in cultivating conditions, all of them demonstrate a multiple increase in *MYCN* expression, as well as the opposite response of *PHOX2A* and *PHOX2B*, indicating a possible role of these genes in glioblastoma resistance to stress. The obtained data should be taken into account while selecting individual treatment for patients, as well as when developing therapeutic agents and further investigating molecular processes in glioblastoma cells.

*Keywords:* glioblastoma, *MYCN*, *MYCC*, *PHOX2A*, *PHOX2B*