

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ**ДЕТЕКЦИЯ СУПРЕССОРА ОПУХОЛЕЙ ПОЧКИ DUSP9 В МОЧЕ ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ****А.Г. Полищук*, Е.И. Якубович, В.И. Евтушенко**

Российский научный центр радиологии и хирургических технологий имени академика А.М. Гранова, 197758, Санкт-Петербург, п. Песочный, ул. Ленинградская, 70; *e-mail: polischouka@mail.ru

DUSP9/МКР-4 принадлежит к семейству биспецифических протеинфосфатаз, негативно регулирующих MAP-киназы (ERK, p38 и JNK). Экспрессия DUSP9 значительно (20-80-кратно) снижена по сравнению с нормальной тканью в 95% исследованных образцов почечно-клеточной карциномы человека. Эти и другие научные данные указывают на то, что DUSP9 является привлекательной мишенью для использования в клинической практике. Однако до сих пор единственным источником клинического материала для исследования экспрессии DUSP9 служили постоперационные биопсийные образцы опухоли. Это значительно ограничивает возможности использования DUSP9 в клинических целях. Целью настоящей работы была оценка возможности обнаружения DUSP9 в моче человека. В работе использовали клетки карциномы почки человека ACHN, трансфицированные DUSP9-экспрессирующим вектором, и образцы мочи 3 здоровых добровольцев. DUSP9 белок детектировали, используя метод Вестерн-блота в лизатах осадков, полученных методом центрифугирования. Мы показали, что белок DUSP9 содержится в осадке фракции мочи, полученной при низкоскоростном центрифугировании (10000 g). Также он присутствует во фракции внеклеточных везикул, обогащенных экзосомами. Полученный результат свидетельствует о том, что анализ экспрессии DUSP9 возможен с помощью жидкостной биопсии. Это может существенно расширить применимость этого анализа в клинических целях.

Ключевые слова: DUSP9/МКР-4 протеинфосфатаза; карцинома почки; внеклеточные везикулы; экзосомы**DOI:** 10.18097/BMCRM00267**ВВЕДЕНИЕ**

DUSP9 (dual specificity phosphatase 9) или МКР-4 (mitogen-activated protein kinase phosphatase-4) принадлежит к семейству протеинфосфатаз, негативно регулирующих ERK1/2, p38 и JNK MAP-киназы, дефосфорилируя их по остаткам тирозина и серин/треонина. Значительное снижение экспрессии DUSP9 в образцах почечно-клеточной карциномы по сравнению с образцами прилежащей условно нормальной ткани почки впервые было обнаружено в 2002 г, а затем подтверждено на большом количестве клинического материала различными исследовательскими группами [1]. Показано, что 20-80-кратное подавление экспрессии гена *DUSP9* отмечено в 95% исследованных опухолевых образцов, в том числе в образцах опухоли, взятых у пациентов на ранних стадиях заболевания [1]. С помощью *in vitro* и *in vivo* моделей было продемонстрировано, что DUSP9 обладает онкосупрессорными свойствами [2]. Результаты, полученные нами и другими научными группами, свидетельствуют о том, что DUSP9 участвует в регуляции процессов метастазирования и пролиферации опухолевых клеток, в приобретении опухолевыми клетками резистентного к терапевтическим препаратам фенотипа, а также может быть одной из мишеней для терапевтического воздействия на метастатическую форму карциномы почки [1, 2].

Накопленные данные позволяют предположить, что DUSP9 может быть использован в клинике для диагностических и, возможно, терапевтических целей.

В диагностических целях анализ экспрессии DUSP9 может позволить обеспечить раннее выявление опухолей почки, а также мониторинг ответа опухоли на терапевтическое воздействие. Использование DUSP9 в этих целях предполагает наличие образцов жидкостной биопсии. Однако до сих пор единственным клиническим материалом, используемым для исследования DUSP9, были постоперационные биопсийные образцы опухоли почки.

В данной работе мы исследовали возможность обнаружения DUSP9 в моче человека.

МЕТОДИКА

В работе использовали клеточную линию карциномы почки человека ACHN, полученную из опухолевых клеток плеврального выпота пациента с метастатическим раком почки (ATCC®CRL-1611™, “Биолот”, Россия). Условия культивирования клеток, процесс конструирования экспрессионной плазмиды, несущей ген *DUSP9*, и метод трансфекции клеток сконструированной плазмидой был описан нами ранее [1, 3]. Также в работе использовали свежесобранные образцы дневной порции мочи от 3 здоровых доноров женского пола одного возраста.

Для обнаружения DUSP9 белка использовали Вестерн-блот анализ. В образцы мочи добавляли смесь ингибиторов протеиназ (Halt™ Protease Inhibitor Cocktail (HPIC), “ThermoFisher”, США), в количествах, указанных производителем, и центрифугировали их при определенных ускорениях. Фракцию, обогащенную экзосомами, получали



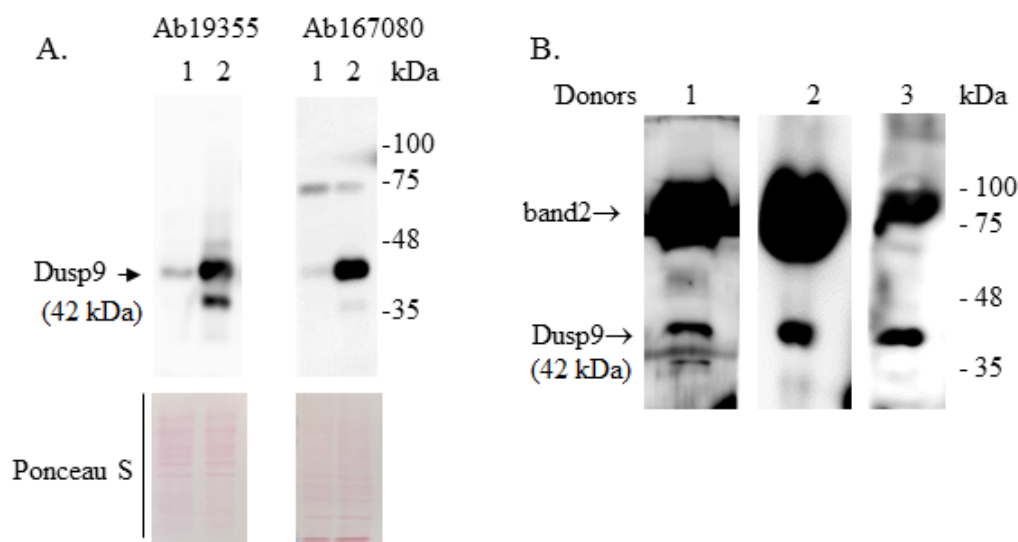


Рисунок 1. Вестерн-блот белков, экстрагированных из АСНН клеток спустя 48 ч после трансфекции (А) и образцов мочи 3 здоровых доноров (В). А.1 – АСНН-клетки, трансфицированные пустым вектором, 2 – клетки, трансфицированные вектором с геном DUSP9. Справа указаны положения белков маркера молекулярного веса. Для контроля равномерности нанесения белков в лунки использовали окраску мембраны Ponceau S. ab194355 и ab167080 – моноклональное и поликлональное кроличьи антитела к DUSP9 (Abcam). В. Белки осадка, полученного при центрифугировании 15 мл мочи при 10000 g в течение 10 мин при 20°C (экстрагированы в RIPA буфере). Для детекции белка DUSP9 использовали ab194355.

методом последовательного центрифугирования. Этот метод считается «золотым стандартом» выделения экзосом и состоит из нескольких последовательных раундов центрифугирования с постепенно возрастающим ускорением [4]. После каждого раунда отбирали супернатант и использовали его в следующем раунде. Последним раундом было ультрацентрифугирование. Центрифугирование проводили по следующей схеме: 400 g (10 мин, 20°C, осаждение клеток) → 2000 g (10 мин, 20°C, фрагменты клеток) → 10000 g (10 мин, 20°C, апоптотические тельца и крупные белковые комплексы) → 100000 g (90 мин, 4°C, нановезикулы, в том числе экзосомы). Полученные после центрифугирования осадки мочи, также как и клетки АСНН, лизировали либо в RIPA буфере (150 mM NaCl, 50 mM трис-HCl, (pH 7.5), 1 mM ЭДТА, 1% (по объему) ТритонX-100, 0.1% (масса/объем) SDS и NPIC, все реагенты “ThermoFisher”) либо в 1x Laemmli Sample Buffer (“Bio-Rad”, США) с добавлением 50 mM дитиотреитола. Белки лизатов разделяли в денатурирующем SDS/полиакриламидном (ПАА) геле и переносили на PVDF мембрану (Hybond P, “Cytiva”, США) в трис-глициновом буфере с метанолом (25 mM трис, 192 mM глицин, 20% (по объему) метанол (pH 8.3)). Неспецифические сайты связывания антител блокировали путем инкубации мембраны в буфере, содержащем 20 mM Трис-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 0.1% (по объему) Tween 20, 5% (масса/объем) BSA (бычий альбумин, фракция V, “Sigma”, США), после чего мембраны инкубировали в течение ночи при 4°C с первичными кроличьими антителами к исследуемым белкам. После отмывки от несвязавшихся первичных антител мембраны инкубировали с козьими антителами к кроличьему IgG, конъюгированными с пероксидазой хрена (ab205718). Все антитела получены из “Abcam” (Великобритания). Комплексы антиген-антитело детектировали с использованием SuperSignal™ West Dura Extended Duration Substrate («ThermoFisher») и хемилюминесцентного детектора ImageQuant LAS 4000 (“GE Healthcare”, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Целью работы была попытка обнаружения белка DUSP9 в образцах мочи человека с помощью Вестерн-блот анализа. В научной литературе нет данных об электрофоретической подвижности DUSP9 при разделении белков из лизатов, полученных из клинических образцов. Однако такие данные существуют для белковых экстрактов, полученных из культивируемых клеток человека, в том числе из клеток карциномы почки человека АСНН [1]. Поэтому для контроля эффективности работы Вестерн-блот анализа мы использовали белковые экстракты из АСНН клеток. Ранее мы показали, что уровень DUSP9 белка в АСНН клетках очень низкий [1]. Поэтому в качестве негативного контроля экспрессии DUSP9 были использованы белковые экстракты из этих клеток, а в качестве позитивного – экстракты из АСНН клеток, трансфицированных сконструированным нами ранее экспрессионным вектором, содержащим последовательности кДНК гена *DUSP9* [3]. Для детекции были использованы ab167080 и ab194355 антитела к DUSP9. Молекулярный вес DUSP9 белка в экстрактах АСНН клеток, трансфицированных вектором с геном *DUSP9*, находится между 35 кДа и 48 кДа (рис.1А), что соответствует литературным данным о размерах этого белка (42 кДа) в клетках культивируемых клеточных линий. В АСНН клетках, трансфицированных вектором без гена *DUSP9*, выявлена полоса небольшой интенсивности, соответствующая размеру DUSP9, отражающая эндогенный уровень DUSP9 белка в самих клетках АСНН. Таким образом, используемые нами условия Вестерн-блот анализа позволяют специфически детектировать DUSP9 в белковых лизатах человеческого биоматериала.

Для обнаружения DUSP9 белка в моче человека был протестирован самый доступный для клинических лабораторий метод низкоскоростного центрифугирования. На наличие DUSP9 белка были проанализированы осадки, полученные при одноразовом центрифугировании различного количества мочи (от 1 мл до 15 мл) при

Таблица 1. Характеристика антител, использованных в исследовании

Антитело к	Клональность антитела	Метод очистки антител	№ по каталогу*
Apolipoprotein B	поли	инактивированная сыворотка крови иммунизированных кроликов, фильтрованная через мембрану с размером пор 0.22 мкм	ab20737
Hsp70	моно	белок А	ab181606
Dusp9	моно	белок А	ab194355
Dusp9	поли	АСАХ	ab167080
Hexokinase 1	моно	белок А	ab150423
Calnexin	моно	белок А	ab133615
Actin	поли	АСАХ	ab8227
Goat anti-rabbit IgG	поли	АСАХ	ab205718

*- все антитела из Abcam. АСАХ - антиген-специфическая аффинная хроматография

разных центробежных ускорениях (400 g, 2000 g, 10000 g, 16000 g), разных температурах центрифугирования (4°C, 20°C, 37°C) и времени центрифугирования (10 мин, 30 мин, 60 мин и 90 мин). Лучший вариант пробоподготовки был выбран на основании сравнения интенсивности DUSP9 полосы с молекулярной массой 42 кДа на Вестерн-блоте. Температура, при которой происходило центрифугирование, не оказывала существенного влияния на результат. Увеличение времени центрифугирования с 10 мин до 30-90 мин также не приводило к улучшению результата. Полоса, соответствующая DUSP9 в области 42 кДа, отсутствовала во фракциях, полученных при 400 g и 2000 g, однако появлялась во фракциях, полученных при 10000 g и 16000 g. В последних двух фракциях интенсивность полосы была одинаковой. Наибольшая интенсивность DUSP9 полосы в 42 кДа была выявлена при объеме пробы мочи 15 мл. На рисунке 1Б представлены результаты анализа осадков, полученных из 15 мл мочи при ее одноразовом центрифугировании в течение 10 мин при 10000 g и температуре 20°C. Видно, что в пробах мочи детектируется специфическая для белка DUSP9 полоса в 42 кДа. Таким образом, белок DUSP9 в образцах мочи человека можно обнаружить, используя низкоскоростное центрифугирование в сочетании с Вестерн-блот анализом.

На рисунке 1В также видно, что кроме специфичной для DUSP9 полосы в 42 кДа существует еще одна интенсивная полоса с молекулярной массой между 75 кДа и 100 кДа (полоса 2). Эта полоса отсутствовала на Вестерн-блотах белковых экстрактов из АСНН клеток (рис. 1А). Возможно, появление этой полосы связано с наличием в моче белка Тамма-Хорсфолла, также известного как уромулин (УМ). Молекулярная масса УМ 95 кДа, что соответствует расположению полосы 2 на SDS-ПАА геле. В моче УМ находится в олигомерном состоянии в виде высокомолекулярных филаментов, образуя полимерную сеть. Показано, что полимерная сеть УМ может захватывать микровезикулы в процессе их осаждения центрифугированием [5]. Поэтому можно предположить, что появление полосы 2 обусловлено захватыванием белка DUSP9 полимерной сетью УМ в процессе центрифугирования, в результате чего DUSP9 визуализируется в том же положении, что и УМ. Также можно предположить, что полоса 2 появляется в результате неспецифического связывания УМ с антителами к DUSP9 белку. Чтобы проверить, так ли это, мы провели иммуноблотинг проб мочи с антителами

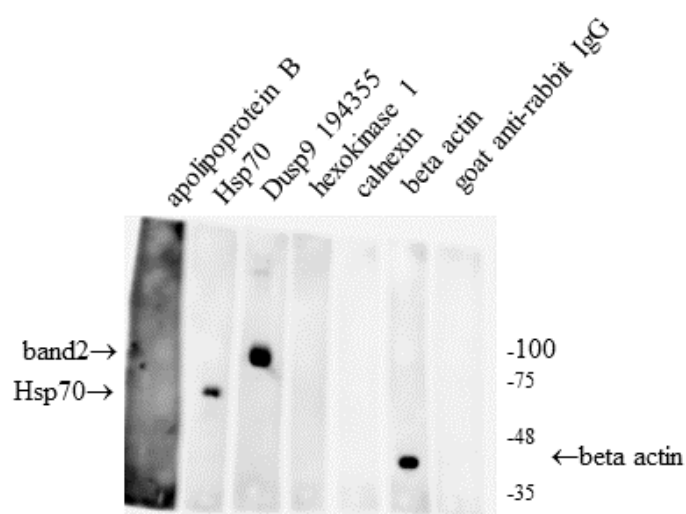


Рисунок 2. Детекция полосы с молекулярной массой 75-100 кДа в образце мочи при использовании кроличьих антител к разным белкам. Образец мочи центрифугировали при 10000 g в течение 10 мин при 20°C. На каждой дорожке аликвоты белков, экстрагированных из 2 мл мочи.

к 5 другим белкам человека (табл. 1, рис.2). Все антитела кроличьи IgG, так же, как используемые нами антитела к DUSP9. Разведение каждого антитела было выбрано так, чтобы концентрации IgG в пробах были одинаковые. Для контроля неспецифического связывания со вторичными антителами были взяты козы антитела к кроличьему IgG. Во всех случаях на дорожки SDS-ПАА геля было нанесено одинаковое количество белкового лизата осадка мочи, полученного при одном и том же выделении. Как видно на рисунке 2, полоса 2 присутствует только на дорожке с антителами к DUSP9. С учетом условий эксперимента, этот результат свидетельствует против неспецифического связывания IgG с УМ либо каким-то белком мочи, имеющим в SDS-ПАА геле такую же подвижность, что и УМ. Еще одним предположением о происхождении полосы 2 может быть посттрансляционная модификация DUSP9. Известно, что DUSP9 является мишенью для убиквитинирования [6]. Вопрос о происхождении полосы 2 на Вестерн-блоте требует дальнейшего изучения.

Ранее мы показали, что белок DUSP9 был обнаружен в экзосомной фракции кондиционной среды от АСНН клеток, трансфицированных DUSP9-экспрессирующим

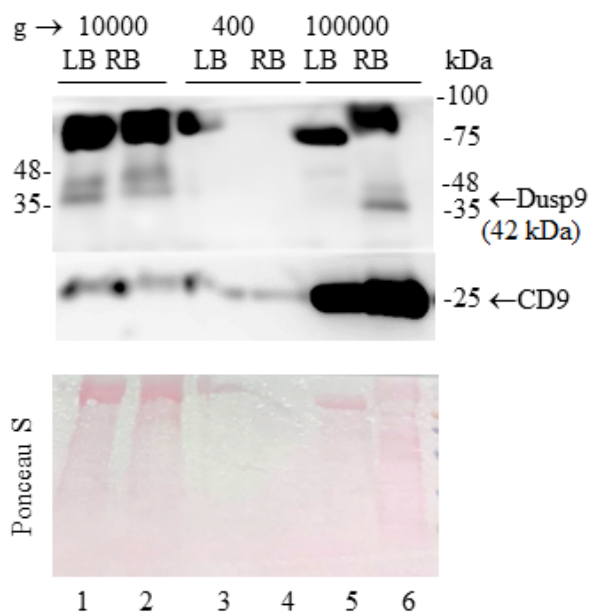


Рисунок 3. Распределение DUSP9 белка с молекулярным весом 42 кДа по фракциям мочи. На каждой дорожке белки, экстрагированные из 15 мл мочи. 1-2 и 3-4 – однократное центрифугирование мочи при 10000 g и 400 g соответственно. 5-6 – последовательное центрифугирование: 400 g → 2000 g → 10000 g → 100000 g. CD9 – маркер экзосом. LB – Laemmli буфер, RB – RIPA буфер.

вектором [1]. Параллельно, мы показали, что миграционная способность трансфицированных ACHN клеток изменена по сравнению с нетрансфицированными. Вместе результаты свидетельствовали о том, что, по крайней мере некоторые функции DUSP9 могут быть опосредованы экзосомами, продуцируемыми тканями мочевыводящей системы. С учетом предыдущих результатов стояла задача определить, будет ли обнаружен DUSP9 белок во фракции мочи, обогащенной экзосомами. Про экзосомы известно, что они представляют собой мембранные пузырьки, формирующиеся клетками различных тканей и органов и транспортирующими биологически активные молекулы в межклеточном пространстве. Работы многих исследовательских групп указывают на то, что экзосомы, продуцируемые опухолью, играют одну из ключевых ролей в процессе канцерогенеза [7]. На рисунке 3 видно, что фракция мочи, полученная методом последовательного центрифугирования, конечным раундом которого было ультрацентрифугирование при 100000 g, обогащена экзосомами (в лизате содержится большое количество белкового маркера экзосом CD9 по сравнению с другими фракциями) и содержит DUSP9 (полоса 42 кДа). Экстракция белков с помощью RIPA буфера, по-видимому, более эффективна, т.к. при использовании Laemmli буфера обнаружить DUSP9 в этой фракции не удалось. Количество обнаруживаемого DUSP9 во фракции 10000 g не зависит от используемого экстракционного буфера. В осадке клеток (400 g) DUSP9 не был обнаружен. Результат свидетельствует о том, что часть DUSP9 белка, находящегося в моче здорового донора, имеет внутринанovesикулярное/экзосомальное происхождение.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Используя Вестерн-блот анализ, мы показали, что протеинфосфатаза DUSP9 может быть детектирована в осадках, полученных из 15 мл мочи здоровых доноров, в результате ее центрифугирования при 10000 g в течение 10 мин. Температура, при которой осуществляется центрифугирование, не влияет на результат. Также DUSP9 присутствует в обогащенной нанovesикулами фракции, полученной методом последовательного центрифугирования, конечным раундом которого является ультрацентрифугирование при 100000 g и 4°C в течение 1.5 ч. Таким образом, полученный результат показал, что экспрессия DUSP9 может исследоваться при использовании жидкостной биопсии, что в свою очередь, мы надеемся, значительно расширит возможности использования анализа экспрессии DUSP9 в клинических целях.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование финансировалось в рамках государственного задания Минздрава РФ №124021600040-2.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследование одобрено этическим комитетом по этике Российского научного центра радиологии и хирургических технологий (протокол № 01-04/2024 от 04 апреля 2024 г.). От здоровых добровольцев получено информированное согласие на участие в исследовании и использовании их биопроб.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Yakubovich, E.I., Polischouk, A.G., Evtushenko, V.I. (2023) Exogenous expression of protein phosphatase DUSP9 reduces the rate of migration of kidney carcinoma cells. *Voprosy Onkologii*, **69**(3), 429–436. DOI: 10.37469/0507-3758-2023-69-3-429-436
2. Khoubai, F.Z., Grosset, C.F. (2021) DUSP9, a dual-specificity phosphatase with a key role in cell biology and human diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, **22**(21), 11538. DOI: 10.3390/ijms222111538
3. Granov, A.M., Vershinina, S.F., Yakubovich, E.I., Markochev, A.B., Yevtushenko, V.I. (2016) The antitumor effect of expression plasmid bearing DUSP9 gene in SHR mice having solid ehrlich carcinoma. *Medicinskij Akadimicheskij Zhurnal*, **16**(3), 75–81.
4. Yakubovich, E.I., Polischouk, A.G., Evtushenko, V.I. (2020) Principles and problems of exosome isolation from biological fluids. *Biochemistry (Moscow), Supplement Series A: Membrane and Cell Biology*, **16**(2), 115–126. DOI: 10.1134/S1990747822030096
5. Fernández-Llana, P., Khositseth, S., Gonzales, P.A., Star, R.A., Pisitkun, T., Knepper, M.A. (2010) Tamm-Horsfall protein and urinary exosome isolation. *Kidney International*, **77**(8), 736–742. DOI: 10.1038/ki.2009.550
6. Chen, H.F., Chuang, H.C., Tan, T.H. (2019) Regulation of dual-specificity phosphatase (DUSP) ubiquitination and protein stability. *International Journal of Molecular Sciences*, **20**(11), 2668. DOI: 10.3390/ijms20112668
7. Tenchov, R., Sasso, J.M., Wang, X., Liaw, W.S., Chen, C.A., Zhou, Q.A. (2022) Exosomes - nature's lipid nanoparticles, a rising star in drug delivery and diagnostics. *ACS Nano*, **16**(11), 17802–17846. DOI: 10.1021/acsnano.2c08774

Поступила: 28.01.2025

После доработки: 03.03.2025

Принята к публикации: 10.03.2025

DETECTION OF THE KIDNEY TUMOR SUPPRESSOR DUSP9 IN THE URINE OF HEALTHY DONORS

A.G. Polischouk, E.I. Yakubovich, V.I. Evtushenko*

Granov Russian Research Center of Radiology and Surgical Technologies,
70 Leningradskaya St., Pesochnyy, Saint-Petersburg 197758, Russia; *e-mail: polischouka@mail.ru

The DUSP9/MKP-4 belongs to the family of bispecific protein phosphatases that negatively regulate MAP kinases (ERK, p38 and JNK). The expression of DUSP9 is significantly (20-80-fold) reduced compared to normal tissue in 95% of the studied human renal cell carcinoma samples. These and other scientific data indicate that DUSP9 is an attractive target for the use in clinical practice. However, so far, postoperative tumor biopsy samples remain the only source of clinical material in which expression of DUSP9 has been studied.. This significantly limits the possibilities of using DUSP9 for clinical purposes. The purpose of this work was to find out whether it would be possible to detect DUSP9 in human urine. In the study we used human kidney carcinoma ACHN cells transfected with a vector, expressing DUSP9 and urine samples from 3 healthy volunteers. DUSP9 protein was detected by the Western blot method in precipitates obtained by centrifugation. We have shown that the DUSP9 protein is present in the pellet of the urine fraction obtained by low-speed centrifugation (10000 g). It is also present in the fraction of extracellular vesicles enriched with exosomes. The obtained result indicates that the analysis of DUSP9 expression is possible using a liquid biopsy, which, in turn, can significantly expand the applicability of this analysis for clinical purposes.

Key words: DUSP9/MKP-4 protein phosphatase; renal carcinoma; extracellular vesicles, exosomes

FUNDING

This work was supported by an assignment of Ministry of Health of Russia №124021600040-2.

Received: 28.01.2025, revised: 03.03.2025, accepted: 10.03.2025