

## Определение метаболических фенотипов в злокачественных клетках

**Кинетический анализ демонстрирует динамическое взаимодействие путей окислительного фосфорилирования и гликолиза**

### ОБЛАСТЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Злокачественное новообразование

### ТИП АНАЛИЗА

Потребление энергии: анализ метаболических путей злокачественных клеток

### КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА

Злокачественное новообразование, гликолиз, митохондрии, окислительное фосфорилирование, OXPHOS, эффект Варбурга, H460

Злокачественная трансформация клеток часто характеризуется анаэробным гликолизом, превращением глюкозы в лактат несмотря на наличие кислорода. Данное изменение метаболизма, известное как эффект Варбурга [1], может возникать в результате активации или мутации онкогенов или опухолевых генов-супрессоров, либо как адаптационная реакция на гипоксию [2]. Напротив, нормальные дифференцированные клетки для образования АТФ используют окислительное фосфорилирование (OXPHOS) [3]. Эти биоэнергетические нарушения, связанные со злокачественной трансформацией, применяются для выявления потенциальных лекарственных препаратов, избирательно действующих на злокачественную опухоль.

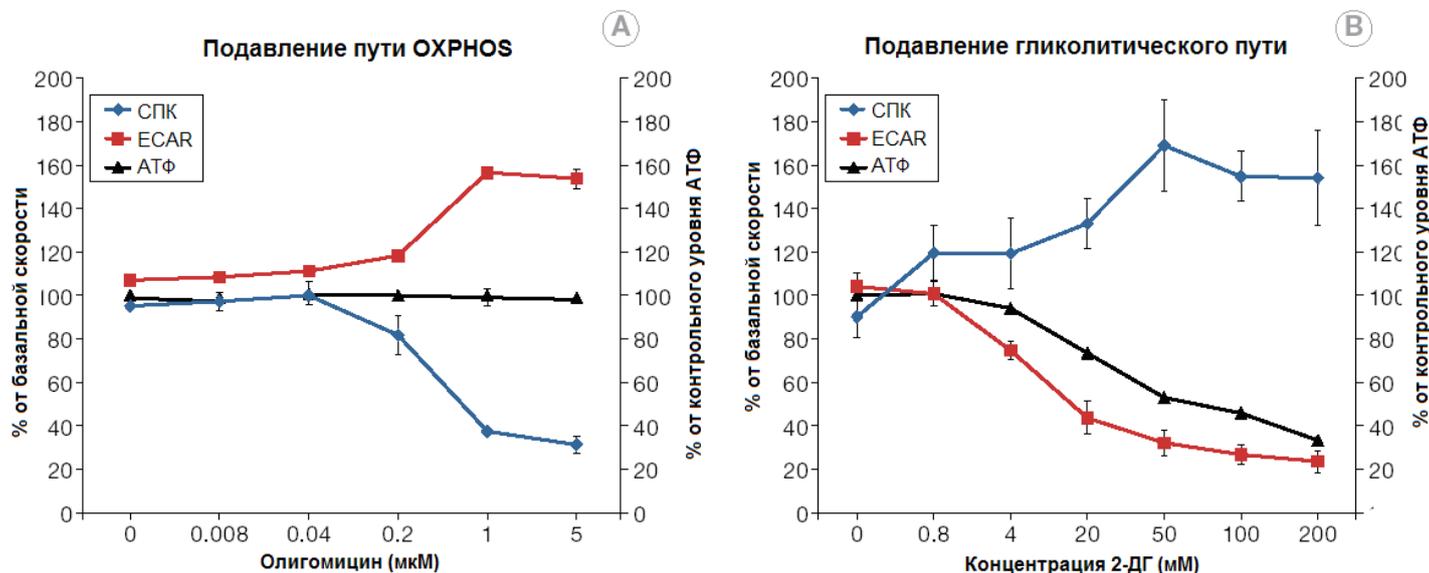
Биоэнергетические анализы злокачественных клеток ограничиваются последовательным и независимым измерением клеточного дыхания, поглощения глюкозы, выработки лактата и функции митохондрий. Несмотря на то, что данные анализы оценивают показатели биоэнергетической функции, они требуют много времени, использования меченных радиоизотопом реагентов и часто не предоставляют данные в режиме реального времени. Анализы внеклеточных потоков XF одновременно измеряют митохондриальное дыхание (OXPHOS) и гликолиз, позволяя провести быструю и более полную оценку биоэнергетики клетки. Анализы XF проводят количественное определение динамического взаимодействия двух основных энергообразующих путей, соотношение которых может быть диагностическим критерием для определенного злокачественного фенотипа.

В ранее опубликованной работе Wu с соавт. описывал использование анализов XF для определения метаболических фенотипов и оценки изменения биоэнергетики в злокачественных клетках [4]. Для фармакологического исследования митохондриального дыхания и гликолиза в качестве модельной системы применяли линию клеток H460 немелкоклеточного рака легких у человека.

Для оценки клеточного ответа на нарушение OXPHOS клетки H460 подвергали воздействию олигомицина, ингибитора  $F_1F_0$  АТФ-синтазы, который блокирует окислительное фосфорилирование. Под действием возрастающих доз олигомицина наблюдалось снижение скорости клеточного дыхания с одновременным усилением гликолиза, как показано на рисунке 1А. Уровни АТФ в клетках, определяемые позднее с последовательным использованием аликвот, сохранялись после воздействия олигомицина, что свидетельствует о наличии эффективной, компенсаторной активации гликолиза для поддержания клеточного уровня АТФ в клетках H460.

**Рисунок 1** | Метаболические зависимости в злокачественных клетках H460

На рисунке 1А показано снижение скорости клеточного дыхания (СПК) и повышение скорости гликолиза (ЕСАР) в ответ на возрастающие дозы олигомицина. Обмен АТФ оставался стабильным. На рисунке 1В представлены изменения в ответ на возрастающие уровни 2-деоксиглюкозы (2-ДГ). Рисунок демонстрирует снижение ЕСАР с сопутствующим повышением СПК в ответ на возрастающие концентрации 2-ДГ. По мере уменьшения скорости гликолиза наблюдалось явное снижение обмена АТФ.



Далее проводилось исследование зависимости биоэнергетики клеток H460 от гликолиза. На рисунке 1В представлена реакция клеточного дыхания и скорость гликолиза после введения 2-деоксиглюкозы (2-ДГ), блокирующей первый этап гликолитического пути. Скорость гликолиза снижалась с сопутствующим усилением дыхания в ответ на возрастающие концентрации 2-ДГ. Уровень АТФ заметно снижался по мере уменьшения скорости гликолиза, несмотря на, казалось бы, небольшое компенсаторное усиление клеточного дыхания.

Данные наблюдения показывают, что клетки H460 зависят, главным образом, от выработки АТФ посредством гликолиза. Несмотря на наблюдаемое увеличение скорости дыхания, не представлялось возможным поддержать концентрации АТФ в клетках, что указывает на вероятное снижение или недостаточную способность к ОХРНOS для удовлетворения возросшего потребления энергии. Длительное воздействие 2-ДГ приводило к гибели клетки, подтверждая зависимость выживания от глюкозы (данные не указаны).

Таким образом, полученные результаты демонстрируют биоэнергетический фенотип в клетках H460 рака легкого у человека, характеризующийся высокой способностью к гликолизу и связанным с этим ослаблением способности к ОХРНOS. Данные метаболические нарушения предоставляют возможное механистическое объяснение преимуществ роста, особенно в условиях гипоксии, и устойчивости к апоптозу вследствие снижения аэробного дыхания в злокачественных клетках H460.

### Обсуждение

Анализы XF обеспечивают одновременное измерение митохондриального дыхания (СПК) и гликолиза (ЕСАР), позволяющее оценивать нарушения и взаимодействие данных путей в злокачественных клетках. Анализы XF также позволяют проводить механистические исследования путей злокачественных клеток в ответ на активацию онкогенов или подавление либо нарушение сигнальных путей, а также воздействия фармакологических модуляторов на данные энергетические пути.

Недавно Хие с соавт. [5] исследовал взаимосвязь между злокачественной трансформацией и биоэнергетикой *in vitro* в модели наследственного лейомиоматоза и рака почки путем угнетения экспрессии фумаратгидратазы с использованием кшРНК (ФГ). Анализы XF показали, что подавление ФГ приводит к ослаблению ОХРНOS (снижению СПК), что требует активации гликолиза в клетках, определяемому по увеличению ЕСАР. Далее Хие интересовало наличие в данных клетках избыточной экспрессии лактатдегидрогеназы-А (ЛДГ-А), фермента, превращающего пируват в лактат, как индикатора их повышенной зависимости от гликолиза, и возможность

усиления апоптоза и снижения туморогенности в результате блокирования ЛДГ-А. Авторы пришли к выводу, что подавление ЛДГ-А на фоне недостаточности ФГ приводит к усилению апоптоза, а также снижению роста опухоли в ксенографических мышинных моделях.

de Groot с соавт. [6] описал повышенную активность ОХPHOS до усиления гликолиза, наблюдаемую в трансформированных H-RasV12/E1A фибробластах с фенотипом Варбурга. По данным анализов XF по мере снижения потребления кислорода в клетке и увеличения числа пассажей наблюдалось усиление превращения глюкозы в молочную кислоту. Авторы предполагают, что изменение клеток в сторону фенотипа Варбурга происходит в виде поэтапного процесса внедрения, обусловленного повышенной туморогенной способностью и улучшенными характеристиками выживаемости трансформированных клеток.

Weinberg и соавт. [7] демонстрировали основную функцию митохондриального метаболизма в Kras-индуцированном образовании опухоли. С помощью анализов XF они определили, что в данных клетках наблюдается усиление митохондриального дыхания, на что указывает повышение СПК, отмечаемое при замене глюкозы на галактозу в культуральной среде клеток. По мере роста клеток в среде с галактозой соотношение СПК и ECAR увеличилось с 5 до 15. Повышение СПК отчасти обусловлено активным окислением глутамина, о чем свидетельствует повышение СПК при добавлении глутамина. Данное исследование указывает на зависимость трансформированных Kras клеток от митохондриального метаболизма в отношении их роста и выживаемости за пределами эффекта Варбурга, подчеркивая, что различные злокачественные клетки имеют разные метаболические фенотипы.

**Анализы XF обеспечивают одновременное измерение митохондриального дыхания (СПК) и гликолиза (ECAR), позволяющее оценивать изменение и взаимодействие данных путей в злокачественных клетках. Анализы XF также позволяют проводить потенциальные механистические исследования путей в злокачественной клетке.**

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Клетки и соединения:** проводили посев клеток H460 в V7 клеточные культуральные микропланшеты XF24 в количестве  $2,0 \times 10^4$  клеток на лунку ( $0,32 \text{ см}^2$ ) в 200 мл питательной среды и инкубировали при температуре  $37^\circ\text{C}$ / 5%  $\text{CO}_2$  в течение 20-24 часов. Затем питательную среду удаляли из каждой лунки и замещали 600 мл среды для проведения анализа при температуре  $37^\circ\text{C}$  и pH 7,4.

При проведении анализа XF в качестве стандартной среды, называемой «средой для анализа», использовали низкобуферную среду RPMI 1640, содержащую 1 мМ фосфата (компания Molecular Devices). 2-ДГ и олигомицин были закуплены у компании Sigma. Концентрированные растворы 1000 мМ 2-ДГ готовили в среде для анализа непосредственно до проведения оценки. Концентрированные растворы 10 мМ олигомицина готовили в ДМСО и хранили при температуре  $20^\circ\text{C}$ .

## Анализ XF

Анализы XF проводились с использованием анализатора внеклеточного потока XF (Seahorse Bioscience), полностью интегрированного, многолуночного прибора, измеряющего поглощение и выведение конечных продуктов метаболизма в режиме реального времени. СПК и ECAR измеряли с помощью набора для анализа XF. Одноразовые наборы для проведения анализа состоят из клеточного культурального планшета XF24 или XF96 и картриджа с твердотельным датчиком со встроенными с 24 или 96 двухфлуоресцентными биосенсорами ( $\text{O}_2$  и  $\text{H}^+$ ). Каждый картридж датчика также оснащен четырьмя камерами (в каждой лунке) для введения препаратов в лунку во время анализа. СПК измеряется в пмоль/мин, ECAR – мрН/мин.

Для подготовки к анализу, как показано на рисунке 2, после переноса клеток H460 из культуральной питательной среды в среду для проведения анализа картридж датчика заполняли экспериментальными соединениями, калибровали и помещали над культуральным планшетом, содержащим приготовленные клетки H460. После смешивания для определения базальной скорости проводили одновременное измерение СПК и ECAR в течение 3 минут. Далее 75 мкл тестируемого препарата, приготовленного в среде для анализа, вводили в каждую лунку до воздействия конечных рабочих концентраций. За этим следовало 5-минутное перемешивание, ускоряющее воздействие соединения на клеточные белки, после чего проводили измерение СПК и ECAR. После добавления соединения измеряли 3 базальные и 3 скорости ответной реакции в трех параллельных анализах, и их значения усредняли. Наблюдаемые показатели СПК и ECAR отражают как метаболическую активность клеток, так и количество определяемых клеток. Далее с помощью люминесцентного метода оценки жизнеспособности клеток

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ФЕНОТИПОВ В ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ КЛЕТКАХ

CellTiter-Glo® (Promega) определяли количество АТФ, содержащегося в тестируемых клетках каждой лунки после 30-минутного воздействия соединения или наполнителя в планшет-ридере.

**Рисунок 2** | Схема проведения анализа XF



## Ссылки

1. Warburg O. *On the origin of cancer cells*. Science. (1956); 123: 309-314.
2. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. *Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation*. Science. (2009); 324 (5930):1029-33.
3. Rolfe DF, Brown GC. *Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals*. Physiol Rev. (1997); 77 (3):731-58.
4. Wu, M., et al. *Multiparameter metabolic analysis reveals a close link between attenuated mitochondrial bioenergetic function and enhanced glycolysis dependency in human tumor cells*. Am J Physiol Cell Physiol (2007); 292:C125-C136.
5. Xie, H., et al. *LDH-A inhibition, a therapeutic strategy for treatment of hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer*. Mol Cancer Ther. (2009); 8 (3):626-635.
6. de Groof AJ, et al. *Increased OXPHOS activity precedes rise in glycolytic rate in H-RasV12/E1A transformed fibroblasts that develop a Warburg phenotype*. Mol Cancer (2009); 8 (1):54.
7. Weinberg F, et al. *Mitochondrial metabolism and ROS generation are essential for Kras-mediated tumorigenicity*. Proc Natl Acad Sci USA. (2010); 107 (19):8788-93.

## Рекомендуемая литература

1. Dang CV. *Rethinking the Warburg effect with Myc micromanaging glutamine metabolism*. Cancer Res. (2010); 70 (3):859-862.
2. Fan, Y., et al. *Akt and c-Myc differentially activate cellular metabolic programs and prime cells to bioenergetic inhibition*. J. Biol. Chem. (2010); 285 (10):7324-733.