

Внеклеточные везикулы глиальных клеток-предшественников человека обладают нейропротекцией путем модуляции пути PI3K-Akt при глутаматной эксайтотоксичности

Шеденкова М.О.^{1, 2*}, Салихова Д.И.^{1, 2}, Некрасова А.А.³, Бакаева З.В.³,
Гольдштейн Д.В.^{1, 2}

¹ НИИ молекулярной и клеточной медицины медицинского института ФГАОУ ВО
«Российский университет дружбы народов», Москва, Россия

² ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени Н.П. Бочкова», Москва, Россия

³ ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России, Москва, Россия

* margarita.shedenkova@gmail.com

Ключевые слова: внеклеточные везикулы; глиальные клетки-предшественники; протеом; нейропротекция; глутаматная эксайтотоксичность; иПСК

Мотивация и цель: Глутамат является одним из основных нейромедиаторов головного мозга. Его действие происходит через метаботропные или ионотропные глутаматные рецепторы, запуская разнообразные каскады, контролирующие процессы внутри клеток. Нарушение гомеостаза глутамата часто сопровождается развитием патологии нервной системы, приводящей к неврологическим и нейродегенеративным заболеваниям [1]. На сегодняшний день не существует препаратов, способных нивелировать токсическое действие глутамата, поэтому поиск новых нейропротективных средств остается актуальной задачей. Сравнительно недавно в группу нейротерапевтических агентов вошли внеклеточные везикулы, благодаря их способности к сохранению внутреннего содержимого и адресному связыванию с целевыми клетками. Целью данного исследования является изучение механизмов нейропротективного действия внеклеточных везикул, полученных из глиальных производных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека (ВВ-ГКП), с помощью комбинированной работы протеомного анализа *in silico* и ингибиторного анализа *in vitro* на модели глутаматной эксайтотоксичности.

Методы и алгоритмы: Культуры глиальных клеток-предшественников были получены ранее от здорового донора путем дифференцировки индуцированных плюрипотентных стволовых клеток в глиальном направлении [2]. ВВ-ГКП получали и анализировали согласно методикам, описанным ранее [3]. Для постановки модели глутаматной эксайтотоксичности использовали первичную культуру кортикальных нейронов из крысят линии Wistar (P0-1). На 10-е сутки культивирования добавляли препараты ВВ-ГКП. На следующий день осуществляли постановку модели глутаматной эксайтотоксичности, согласно указанной методике [4]. Оценку выживаемости проводили с помощью МТТ-теста. Протеомный анализ ВВ-ГКП проводили с использованием хроматографической системы Ultimate 3000 Nano LC System, сопряженной с масс-спектрометром Q Exactive HF. Масс-спектрометрические данные сохранялись при автоматическом переключении между MS1 сканированием и вплоть до 15 MS/MS-сканирований

(метод topN). Масс-спектрометрические данные с прибора были конвертированы в масс-листы формата MGF (Mascot Generic Format) с помощью MSConvert (ProteoWizard Software Foundation). Для более тщательной идентификации белков был сгенерирован список пиков, который был проанализирован программами MASCOT (версия 2.5.1) и X! Tandem (ALANINE, 2017.02.01) с использованием базы данных UniProtKB, таксон Homo Sapiens. Проверку статистической достоверности идентификаций осуществляли на основании поиска по реверсированной базе данных белковых последовательностей (decoy reversed database). Полученный список белков анализировали с помощью программы String 8.11. Для подтверждения активации обнаруженного протеомным анализом пути выживания – PI3K-Akt использовали селективный ингибитор субъединицы PI3K γ – AS605240 (1мкг/мл). Для статистической обработки данных МТТ-теста (односторонний тест ANOVA с пост-хок тестом Холм-Шидака и поправкой на множественные сравнения) использовали программу SigmaPlot 12.5. Данные представлены в виде среднего значения и стандартного отклонения.

Результаты: При анализе биоинформатических результатов белки были категоризированы согласно их локализации и участию в биологических процессах. По локализации 60 % идентифицированных белков относится к группе «внеклеточные везикулы». Это позволяет предположить, что был получен препарат, обогащенный ВВ-ГКП. 13 и 5 % обнаруженных белков, относятся к группам «белковый мембранный комплекс» и «везикулярное окаймление», которые возможно локализованы в мембранах самих везикул. Кроме того, 8, 7 и 4 % белков были отнесены к категориям «люмен секреторных гранул», «мембрана Гольджи» и «поздняя эндосома» соответственно (особенно разнообразные белки семейства Rab (из суперсемейства Ras малых ГТФазных белков). Среди групп биологических процессов наиболее представленными, являются категории: «метаболические процессы» (60 %), «процессы иммунной системы» (28 %) и «клеточная коммуникация» (26 %). Также, были выделены группы: «негативная регуляция клеточной гибели» (9 %), например, белок 14-3-3, являющийся прямым ингибитором белка Bad; «окислительно-восстановительные процессы» (8 %); «ответ на снижение уровня кислорода» (6 %), в которых были обнаружены разнообразные пероксиредоксины: пероксиредоксин-6, пероксиредоксин-4; «позитивная регуляция нейrogenеза» (5 %); «NIK-Nf-kB сигналинг» (4 %), с идентифицированными белками, например, субъединицы ядерного фактора «каппа-би» (Nf-kB) комплекса; «регенерация» (2 %).

Также был проведен анализ белков по различным базам данных: KEGG и Reactome pathways. Среди установленных сигнальных путей KEGG стоит особо отметить «сигнальный путь PI3K-Akt», который является одним из основных путей, способствующих выживанию нейроглиальных клеток при нейротоксичности. Из проанализированных белков был выделен 51 белок, относящийся к данному пути, например: субъединицы рецепторов ITGA и ITGB, а также обе субъединицы HSP90 и все субъединицы белка Ras, которые состоят в комплексе активатора AKT. Кроме того, были обнаружены пути «MAPK сигналинг» (2,3 %), «mTOR сигналинг» (2 %), «HIF-1 сигналинг» (2 %), «аппелин сигналинг» (2 %), «релаксин сигналинг» (2 %), «AMPK сигналинг» (2 %), нейротрофиновый сигналинг (1 %) и «TGF-beta сигналинг» (1 %), которые также принимают участие в нейропротекции. На основании базы данных Reactome pathways были выделены следующие категории: «метаболизм» (24 %), «иммунная

систем» (23 %), «развитие нервной системы» (13 %), «навигация аксонов» (13 %), «гемостаз» (9 %), «сигналинг с помощью рецепторов ROBO» (около 9 %), «PI3K активируемые сигналы АКТ» (4 %), «рецепторы нейротрансмиттеров и постсинаптическая передача сигнала» (2 %), «сигналинг EPH-Ephrin» (2 %), «сигналинг под действием VEGF» (2 %), «сигнализация с помощью NTRKs» (1.5 %), «активация MAP2K и MAPK» (1 %), «детоксикация реактивных форм кислорода» (1 %) и «mTORC1-опосредованная сигнализация» (1 %).

На модели глутаматной эксайтотоксичности наблюдали снижение числа жизнеспособных кортикальных нейронов на 37.5 ± 4.03 % при добавлении 100 мкМ глутамата по сравнению с группой контроля, которая принималась за 100 %. Добавление препарата ВВ-ГКП (10 мкг/мл) достоверно увеличивало количество жизнеспособных клеток до контрольных значений ($p < 0.001$). Также было установлено, что присутствие AS605240 (1 мкг/мл) одновременно с ВВ-ГКП полностью нивелировало нейропротекторное действие препарата ($p < 0.001$). Это позволяет предположить, что основным из активируемых путей выживания нейронов является именно PI3K-Akt сигнальный путь.

Выводы: Полученные результаты свидетельствуют о том, что ВВ-ГКП обладают нейропротекторным действием при глутаматной эксайтотоксичности благодаря содержащимся в них белкам, снижающих гибель нейронов с помощью различных механизмов и сигнальных путей, среди которых подтверждено участие сигнального пути PI3K-Akt. Эти данные позволяют предположить, что ВВ-ГКП могут стать новым видом терапевтического препарата для лечения неврологических заболеваний.

Финансирование: Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (проект № КБК 075 0110 47 1 S7 24600 621) по теме «Разработка новых лекарственных средств для терапии неврологических заболеваний».

Extracellular vesicles of human glial progenitor cells exhibit neuroprotection by modulating the PI3K-Akt pathway in glutamate excitotoxicity

Shedenkova M.O.^{1, 2*}, Salikhova D.I.^{1, 2}, Nekrasova A.A.³, Bakaeva Z.V.³, Goldshtein D.V.^{1, 2}

¹ RUDN University, Moscow, Russia

² Research Centre for Medical Genetics, Moscow, Russia

³ National Medical Research Center for Children's Health, Moscow, Russia

* margarita.shedenkova@gmail.com

Key words: extracellular vesicles; glial progenitor cells; proteome; neuroprotection; glutamate excitotoxicity; iPSCs

Motivation and Aim: Glutamate is one of the main neurotransmitters in the brain. Its action occurs through metabotropic or ionotropic glutamate receptors, triggering a variety of cascades that control processes inside cells. Disruption of glutamate homeostasis is often accompanied by the development of nervous system pathology leading to neurological and neurodegenerative diseases [1]. To date, there are no drugs

capable of leveling the toxic effect of glutamate, so the search for new neuroprotective agents remains an urgent task. Comparatively recently, extracellular vesicles have joined the group of neurotherapeutic agents because of their ability to preserve their internal content and targeted binding to target cells. The aim of this study is to investigate the mechanisms of neuroprotective action of extracellular vesicles derived from glial progenitor cells (EV-GPC) of human induced pluripotent stem cells using the combined work of *in silico* proteomic analysis and *in vitro* inhibitor assay in a model of glutamate excitotoxicity.

Methods and Algorithms: Glial progenitor cell cultures were obtained previously from a healthy donor by differentiation of induced pluripotent stem cells in the glial direction [2]. EV-GPCs were obtained and analyzed according to the methods described previously [3]. Primary culture of cortical neurons from Wistar rats (P0-1) was used to set up a model of glutamate excitotoxicity. On the 10th day of cultivation EV-GPC drugs were added. On the next day, the model of glutamate excitotoxicity was performed according to the indicated method [4]. Survival was assessed using the MTT test.

Proteomic analysis of EV-GPC was performed using an Ultimate 3000 Nano LC System chromatography system interfaced with a Q Exactive HF mass spectrometer. Mass spectrometric data were stored by automatically switching between MS1 scans and up to 15 MS/MS scans (topN method). Mass spectrometric data from the instrument were converted to Mascot Generic Format (MGF) mass sheets using MSConvert (ProteoWizard Software Foundation). For more thorough protein identification, a peak list was generated and analyzed by MASCOT (version 2.5.1) and X! Tandem (ALANINE, 2017.02.01) using the UniProtKB database, taxon Homo Sapiens. The statistical reliability of the identifications was checked by searching the decoy reversed database (decoy reversed database). The obtained list of proteins was analyzed using String 8.11 program. To confirm the activation of the PI3K-Akt survival pathway detected by proteomic analysis, a selective inhibitor of PI3K γ subunit – AS605240 (1 μ g/ml) was used. SigmaPlot 12.5 program was used for statistical processing of MTT-test data (one-way ANOVA with Holm-Shidak post-hoc test and correction for multiple comparisons). Data are presented as mean value and standard deviation.

Results: In the analysis of bioinformatic results, proteins were categorized according to their localization and involvement in biological processes. Based on localization, 60 % of the identified proteins belonged to the “extracellular vesicles” group. This suggests that a EV-GPC-enriched drug was obtained. 13 and 5 % of the detected proteins, belong to the groups “protein membrane complex” and “vesicular fringing”, which are possibly localized in the membranes of the vesicles themselves. In addition, 8, 7, and 4 % of the proteins were categorized as “secretory granule lumen”, “Golgi membrane”, and “late endosome”, respectively (especially the diverse Rab family proteins (from the Ras superfamily of small GTPase proteins). Among the groups of biological processes, the most represented categories are: “metabolic processes” (60 %), “immune system processes” (28 %) and “cell communication” (26 %). Also, next groups were identified: “negative regulation of cell death” (9 %), such as protein 14-3-3, which is a direct inhibitor of Bad protein; “redox processes” (8 %); “response to reduced oxygen levels” (6 %), in which a variety of peroxiredoxins were found: peroxiredoxin-6, peroxiredoxin-4; “positive regulation of neurogenesis” (5 %); “NIK-Nf-kB signaling” (4 %), with identified proteins such as the subunit of the nuclear factor kappa-bi (Nf-kB) complex; “regeneration” (2 %).

Proteins were also analyzed against different databases: KEGG and Reactome pathways. Among the identified KEGG signaling pathways, the “PI3K-Akt signaling pathway” is of particular note, which is one of the main pathways contributing to the survival of neuroglial cells during neurotoxicity. From the proteins analyzed, 51 proteins belong to this pathway, such as: ITGA and ITGB receptor subunits, as well as both subunits of HSP90 and all subunits of Ras protein, which are members of the AKT activator complex. In addition, we found MARK signaling (2.3 %), mTOR signaling (2 %), HIF-1 signaling (2 %), appelin signaling (2 %), relaxin signaling (2 %), AMRK signaling (2 %), neurotrophin signaling (1 %), and TGF-beta signaling (1 %) pathways that are also involved in neuroprotection. Based on the Reactome pathways database, the following categories were identified: “metabolism” (24 %), “immune system” (23 %), “nervous system development” (13 %), “axon navigation” (13 %), “hemostasis” (9 %), “ROBO receptor-mediated signaling” (about 9 %), “PIP3-activated AKT signaling” (4 %), “neurotransmitter receptors and postsynaptic signal transduction” (2 %), “EPH-Ephrin signaling” (2 %), “VEGF-activated signaling” (2 %), “NTRKs-mediated signaling” (1.5 %), “MAP2K and MAPK activation” (1 %), “detoxification of reactive oxygen species” (1 %), and “mTORC1-mediated signaling” (1 %).

In the glutamate excitotoxicity model, a 37.5 ± 4.03 % decrease in the number of viable cortical neurons was observed when 100 μ M glutamate was added compared to the control group (100 %). The addition of EV-GPC (10 μ g/mL) significantly increased the number of viable cells to control values ($p < 0.001$). It was also found that the presence of AS605240 (1 μ g/mL) simultaneously with EV-GPC completely negated the neuroprotective effect of the drug ($p < 0.001$). This suggests that it is the PI3K-Akt signaling pathway that is the major neuronal survival pathway activated.

Conclusions: The results obtained indicate that EV-GPC have a neuroprotective effect in glutamate excitotoxicity because of the proteins they contain that reduce neuronal death through various mechanisms and signaling pathways, among which the involvement of the PI3K-Akt signaling pathway was confirmed. These data suggest that EV-GPC may become a new type of therapeutic drug to treat neurological diseases.

Funding: The study is supported by the Ministry of Education and Science of the Russian Federation (project No. KBK 075 0110 47 1 S7 24600 621) on the topic “Development of new drugs for the therapy of neurological diseases”.

Список литературы/References

1. Andersen J.V. et al. Glutamate metabolism and recycling at the excitatory synapse in health and neurodegeneration. *Neuropharmacology*. 2021;196:108719
2. Salikhova D. et al. Therapeutic effects of hipsc-derived glial and neuronal progenitor cells-conditioned medium in experimental ischemic stroke in rats. *Int J Mol Sci*. 2021;22(9):4694
3. Turovsky E.A. et al. Mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles afford neuroprotection by modulating PI3K/AKT pathway and calcium oscillations. *Int J Biol Sci*. 2022;18(14):5345-5368
- Zgodova A. et al. Isoliquiritigenin Protects Neuronal Cells against Glutamate Excitotoxicity. *Membranes*. 2022;12(11):1052