

УДК 577.27

ЧТО КОНТРОЛИРУЕТ ЭКСПРЕССИЮ АНТИГЕНА ТОМСЕНА–ФРИДЕНРАЙХА НА ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ?

Обзор

© 2015 Уве Карстен*, Штеффен Голец

*Glycotope GmbH, Robert-Rossle-Str. 10, D-13125 Berlin-Buch,
Germany; fax: +49-30-94892609, E-mail: uwe_karsten@gmx.de,
steffen.goletz@glycotope.com*

Поступила в редакцию 01.02.15
После доработки 23.03.15

Злокачественная трансформация тесно связана с изменениями в гликозилировании белков и липидов, которые в свою очередь вносят вклад в инвазивное и метастатическое поведение опухолевых клеток. Одним примером таких изменений является демаскировка обычно скрытой структуры кор-1, известной также как «антиген Томсена–Фриденрайха», – высокоспецифичного опухолевого гликотопа и потенциального маркера раковых стволовых клеток. В данном обзоре собраны имеющиеся данные о механизме(ах) его экспрессии на опухолевых клетках. Новые данные указывают на тесную связь между метаболизмом опухоли и функционированием аппарата Гольджи. На основании этих данных мы предполагаем, что экспрессия данного антигена является еще и маркером аэробного гликолиза.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: гликозилирование, Гольджи, кор-1, Томсен–Фриденрайх, гликолиз, метаболизм опухоли, рН.

Gal β 1-3GalNAc α 1-Thr/Ser (таблица) представляет собой коровий мотив (кор-1) и промежуточную структуру в биосинтезе O-гликанов муцинового типа. Кор-1 был открыт случайно как антиген, связанный с группой крови (присутствующий в контаминированных эритроцитах), в середине 20-х гг. прошлого столетия и назван по имени авторов «антигеном Томсена–Фриденрайха» (ТФ или Т) [1]. Его химическая природа была описана Герхардом Уленбруком в 1960-х гг. [2]. Однако только в 1975 г. Жорж Ф. Спрингер обнаружил, что ТФ на самом деле является антигеном опухоли или, более корректно, раково-эмбриональным антигеном [3, 4]. С тех пор исключительная встречаемость этой гликановой структуры в опухолевых тканях взрослого человека [5, 6] и широкое распределение в опухолях были подтверждены во множестве работ (например, [7–11]). Несмотря на это, антиген ТФ привлекает гораздо меньше внимания, чем другие опухолевые антигены. Одной из причин может быть то, что это гликан, а не бе-

лок. Для его изучения требуется другой экспериментальный подход, а его экспрессия регулируется неоднородными и сложными правилами. Другим фактором является то, что специфические антитела к этой структуре сложно генерировать, и они довольно редки [12].

Хотя опухолевая специфичность нахождения ТФ в тканях взрослого человека очень высока, этого нельзя сказать о чувствительности. Иммуногистохимические исследования показали, что ТФ экспрессируется во многих типах опухолей, особенно в эпителиальных опухолях. Однако процент положительных примеров в различных типах карциномы варьирует от почти 100% при раке яичников, 85% при раке молочной железы, 60% при раке толстой кишки и 50% при остром лимфолейкозе (Т-клеточный ОЛЛ) до ~15% при почечно-клеточном раке. Кроме того, варьирует и доля ТФ-положительных клеток в конкретных опухолях. Исследования на клеточных линиях человека выявили схожий профиль экспрессии. В то время как нормальные (незлокачественные) клеточные линии полностью ТФ-отрицательны, линии опухолевых клеток в большинстве, но не во всех случаях, ТФ-положительны, и часто даже после клонирования окрашиваются не все клетки. Кроме

Принятые сокращения: ТФ – раково-эмбриональный антиген Томсена–Фриденрайха (Т-антиген), V-АТРаза – вакуолярная Н⁺-АТРаза.

* Адресат для корреспонденции.

Структуры гликанов, упомянутых в обзоре

Гликан (синоним)	Структура
Tn	GalNAc α 1-
Кор-1 (TF, TF α или T)	Gal β 1-3GalNAc α 1-
Кор-2	Gal β 1-3(GlcNAc β 1-6)GalNAc α 1-
Кор-3	GlcNAc β 1-3GalNAc α 1-
TF β	Gal β 1-3GalNAc β 1-
Сиалил-Tn (s-Tn, SiaTn)	NeuNAc α 2-6GalNAc α 1-
Сиалил-TF (s-TF, SiaTF, 6-SiaTF)	Gal β 1-3(Neu5Ac α 2-6)GalNAc α 1-

того, процент положительных клеток в любой клеточной линии может со временем меняться по неизвестным причинам.

Вариабельность экспрессии гликотопа Томсена–Фриденрайха на раковых клетках, очевидно, влияет на возможность использовать его в качестве терапевтической мишени. Некоторые данные позволяют предположить, что TF может быть (не обязательно эксклюзивным) маркером раковых стволовых клеток [13]. В этом случае TF был бы многообещающей терапевтической мишенью, независимо от его отсутствия на некоторых участках опухоли. Таким образом, механизм, приводящий к экспрессии этого исключительного опухолевого антигена, должен представлять значительный интерес.

МОЛЕКУЛЫ-НОСИТЕЛИ КОРА-1/TF

Сам по себе TF в организме человека не существует. Он экспрессируется исключительно на белках-носителях. Неизвестно, встречается ли он также на гликолипидах. Гликолипиды часто имеют близкий по структуре гликан, Gal β 1-3GalNAc β 1- (т.н. TF β -антиген), отличающийся по иммунологическим свойствам и не являющийся, по сути, опухолевым антигеном. Возникает два вопроса: во-первых, какие белки являются белками-носителями для TF, и, во-вторых, как распределены эти молекулы-носители.

TF представляет собой универсальную первичную (кор-1) последовательность О-гликанов. Он присутствует практически на всех мембранных гликопротеинах муцинового типа, оставаясь при этом иммунологически замаскированным удлинением углеводной цепи. Поскольку

экспрессия (или, более корректно, демаксимировка) TF на опухолевых клетках обычно считается результатом нарушения (обрыва) гликозилирования [14], многие гликопротеины после злокачественной трансформации должны, теоретически, становиться кандидатами в носители TF. Однако это, по всей видимости, не так. В вестерн-блоттинге продуктов лизиса опухолевых клеток наблюдается либо только одна, либо очень мало TF-положительных полос. На настоящий момент идентифицировано только несколько белков-носителей [13, 15]. Каждый из них, по всей видимости, является характерным для определенных типов опухолей, например, CD44 для рака толстой кишки, MUC1 для рака молочной железы или CD34 для лейкемии. Любопытно, что большинство этих белков являются известными маркерами стволовых клеток [13]. Причина такой селективности неизвестна. Самым простым объяснением было бы то, что идентифицированные молекулы-носители представляют собой наиболее широко представленные гликопротеины в данных клетках. Однако тот факт, что в большинстве случаев не все клетки опухоли TF-положительны, является доводом в пользу селективности процесса. Это явно отличается от случая эмбриональных эпителиальных клеток, а также нормальных взрослых клеток после обработки сиалидазой, поскольку в этом случае практически *все* эпителиальные клетки TF-положительны. Таким образом, вопрос, что контролирует экспрессию TF на клетках опухоли, становится еще более важным.

ДОКАЗАТЕЛЬСТВА ИЗМЕНЕНИЯ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ

Первый вопрос, который следует задать — имеются ли в клетках опухоли общие изменения в экспрессии и/или активности ферментов, участвующих в биосинтезе гликана, например, гликозилтрансфераз? Этот вопрос был изучен в многочисленных исследованиях и рассмотрен в нескольких обзорах [16–19]. Недостатком большинства этих исследований является то, что они были выполнены на клеточных линиях опухолей, которые в большинстве случаев были получены из асцитных клеток и отличаются от первичных опухолей.

Наиболее изученными в отношении дефектов гликозилирования типами опухолей являются рак толстой кишки и рак молочной железы. Нормальные эпителиальные клетки *толстой кишки* экспрессируют преимущественно гликаны типа кор-3 (таблица), в то время как клетки колоректального рака экспрессируют

кор-1 и другие короткие гликановые цепи. При раке толстой кишки содержание фермента, отвечающего за достраивание первого остатка GalNAc до кора-3 (core3GlcNAcT), понижено [16]. Это может перенаправлять процесс гликозилирования в сторону кора-1. Аналогичным образом C2GnT2, отвечающая за дальнейшее удлинение кора-3, также присутствует в меньших количествах [20]. Интерпретация данных по некоторым другим ферментам затруднена. Например, в исследовании, включавшем 40 первичных случаев колоректального рака, методом ПЦР в реальном времени были изучены четыре релевантные гликозилтрансферазы (и, частично, их ферментативная активность), и результаты сравнили с данными по экспрессии TF [21]. При колоректальном раке содержание трех сиалилтрансфераз, которые способны модифицировать (маскировать) кор-1, было повышено, но не в обратной зависимости от экспрессии кора-1 (TF), как можно было бы ожидать. Нормальные эпителиальные клетки *молочной железы* экспрессируют в основном гликаны, соотносящиеся к кору-2 (таблица). Клетки рака молочной железы содержат сиалил-Tn, TF и сиалил-TF. При раке молочной железы стабильно сверхэкспрессируется ST3Gal-I [22]. В то же время экспрессия C2GnT1 ниже, чем в нормальных тканях молочной железы [22], что согласуется с наблюдаемым снижением содержания гликанов кор-2 и накоплением TF. В других исследованиях не было обнаружено мутаций или существенных изменений релевантных трансфераз. Среди сотен образцов рака молочной железы не наблюдалось признаков потери активности трансферазы кор-1 (C1GalT) [23]. В недавнем исследовании 46 случаев рака поджелудочной железы не обнаружено признаков мутации любой из >200 изученных трансфераз [24]. Вместо этого было показано, что в 40% случаев шаперон COSMC гиперметилирован. COSMC необходим для проявления активности C1GalT1 [25]. Другим аспектом, на который стоит обратить внимание, является доступность необходимых количеств субстратов для трансфераз, которая зависит от активности соответствующих ферментов-транспортёров. Например, трансфекция транспортёром UDP-Gal приводит к экспрессии TF в клетках толстой кишки [26]. С этим согласуется тот факт, что содержание мРНК для транспортёра UDP-Gal в тканях рака толстой кишки повышено [26].

В совокупности наблюдаемые изменения в экспрессии или активности только релевантных ферментов, скорее всего, недостаточны для объяснения феномена экспрессии мотива кор-1 на клетках опухоли. Поэтому мы должны обратить внимание на изменения, происходящие в струк-

туре и функции аппарата Гольджи во время процесса злокачественной трансформации.

ДОКАЗАТЕЛЬСТВА НАРУШЕНИЯ В АППАРАТЕ ГОЛЬДЖИ И РОЛЬ pH

Имеются неоспоримые доказательства, что каждая гликозилтрансфераза имеет свое собственное место в цистерне комплекса Гольджи, и что этот факт крайне важен для нормального биосинтеза гликанов [27, 28]. Любое нарушение их специфической локализации приводит к синтезу «неправильных» гликанов. Это также можно наблюдать на нормальных клетках в экспериментальных условиях. Мы показали, что сверхэкспрессия не являющегося ферментом трансмембранного белка Гольджи RCAS1 (EВAG9) в эмбриональных клетках почек человека (HEK293) приводит к экспрессии TF и Tn на клеточной мембране [29]. Это можно объяснить механическим смещением гликозилтрансфераз с их обычных мест.

Было неоднократно показано, что в аппарате Гольджи злокачественных клеток расположение гликозилтрансфераз и других молекул является аномальным. Например, в клетках рака толстой кишки определенные белки Гольджи были обнаружены в неправильном месте [30]. В T-47D клетках рака молочной железы ST6GalNAc-1 локализована во всем аппарате Гольджи вместо его обычного расположения в *цис*-Гольджи, и считается, что это изменение отвечает за увеличение экспрессии укороченных гликанов [31]. В другом примере GalNAc-трансферазы T1–T3 в клетках HeLa расположены по всей органелле [32]. В качестве одной из возможных причин перераспределения гликозилтрансфераз и/или экспрессии TF было предложено повышение pH в аппарате Гольджи [33, 34].

Любопытно, что еще в 1986 г. было показано неполное гликозилирование в результате экспериментального повышения pH Гольджи в плазмодитах [35]. Эта обработка также приводила к потере поляризованного транспорта секреторных белков, что подчеркивает важность низкого pH для секреторного пути [36]. Недавно Сакари Келлокумпу с соавт. использовали более сложные модели [37]. Они изучили нормальные и злокачественные клеточные линии, а также образцы тканей из нормальной и опухолевой толстой кишки и обработали клеточные линии бифиломицином A₁ (BafA₁) и другими pH-диссипирующими препаратами. BafA₁ является специфическим ингибитором вакуолярной H⁺-АТФазы (V-АТФазы), основного протонного насоса в аппарате Гольджи. После обработки BafA₁ нор-

мальный градиент рН в комплексе Гольджи (от 6,7 в *цис*-Гольджи до 6,0 в *транс*-Гольджи) менялся на константную величину рН около 6,8 [38]. В экспериментах Келлокумпу с соавт. [37] подобная обработка нормальных клеток почек крыс (NRK) и других клеточных линий приводила к структурной дезорганизации аппарата Гольджи и экспрессии TF. Структурная дезорганизация аппарата Гольджи и экспрессия TF также наблюдались в клетках колоректального рака, но не в нормальной кишечной слизистой оболочке. Другим примером являются клетки MCF7 рака молочной железы (с дефектом повышения кислотности) и сублинии MCF7/AdrR с нормальной кислотностью, на которых было показано, что в сублинии потенциал нормального гликозилирования восстанавливается параллельно с восстановлением внутриклеточного градиента рН [37]. Наблюдающаяся корреляция между экспрессией TF и повышением величины рН в аппарате Гольджи была в значительной мере подтверждена в дальнейших исследованиях [39]. Прямое измерение значений рН в Гольджи выявило значительные различия между нормальными и злокачественными клетками (~6,2 в нормальных фибробластах человека в сравнении с ~6,8 в опухолевых клетках MCF7, HT29 и SW48). Обработка (незлокачественных) клеток COS-7 рН-диссипирующими препаратами (BafA₁, хлорокином или NH₄Cl) привела к повышению величины рН в Гольджи и (внутриклеточной) экспрессии TF. Было показано, что повышения рН на 0,2 ед достаточно для ингибирования терминального гликозилирования. Наконец, рН люмена Гольджи был отдельно изучен в мозаичных клетках MCF7 (TF⁺ и TF⁻). Было показано, что рН в промежуточном Гольджи в TF⁺ клетках на ~0,3 ед выше, чем в TF⁻ клетках. Дальнейшие исследования показали, что повышение рН в Гольджи, сходное по своему эффекту с O-гликозилированием, также приводит к неполному гликозилированию N-гликанов [40, 41]. Недавние исследования пролили свет на механизм(ы) наблюдающейся чувствительности гликозилирования к величине рН. Давно известно, что аппарат Гольджи содержит определенные гетеромерные комплексы гликозилтрансфераз, которые гарантируют упорядоченный биосинтетический процессинг гликановых цепей [28]. Эти комплексы ферментов стабильны при низких, но распадаются при нейтральных значениях рН [42]. Образование гетеромеров гликозилтрансфераз при низких значениях рН, их распад и образование гомомеров при нейтральных значениях рН являются частью нормального цикла миграции этих ферментов [43], который, очевидно, нарушен в раковых клетках.

В заключение отметим, что помимо случайных изменений в активности или экспрессии отдельных трансфераз или транспортеров субстратов у наблюдаемых изменений в гликозилировании клеток есть и более общая причина, которая, по всей видимости, связана с частичной или полной утратой низких значений рН в люмене аппарата Гольджи.

Следующий вопрос состоит в том, чем можно объяснить исчезновение градиента рН в Гольджи злокачественных клеток. Сначала вкратце рассмотрим нормальную регуляцию рН в цистернах Гольджи. Известно, что за нее отвечают три основные системы транспорта ионов: вакуолярная H⁺-АТРаза (V-АТРаза), регулятор рН Гольджи (GNHR) и ионообменник AE2a [38, 44–46]. Первый постоянно закачивает ионы H⁺ в люмен Гольджи. Второй представляет собой каналный белок, который опосредует проводимость противоионов для поддержания потенциала мембраны. Третий является Гольджи-специфическим HCO₃⁻/Cl⁻-обменником, отвечающим за буферизацию рН в Гольджи во время процесса импорта и экспорта белков. Все три системы должны противодействовать постоянному пассивному оттоку протонов из Гольджи. В настоящий момент, однако, нет общего объяснения, почему в раковых клетках нарушается регуляция рН в аппарате Гольджи [44].

Поэтому нам следует обратить внимание на один из главных отличительных признаков рака: изменения в метаболизме, наступающие во время злокачественной трансформации, поскольку они приводят к глобальным изменениям рН внутри клеток опухоли и вокруг них.

ИЗМЕНЕНИЯ В МЕТАБОЛИЗМЕ

В середине 20-х гг. прошлого столетия Отто Варбург показал, что в клетках опухолей метаболизм глюкозы переключается с окислительного фосфорилирования на гликолиз даже в среде с нормальным содержанием кислорода (аэробный гликолиз) [47]. После десятилетий повсеместного забвения этот факт вновь оказался в центре внимания несколько лет назад и стал одним из основных отличительных признаков рака [48]. Смена метаболизма приводит к обращению градиента рН в клеточной мембране, т.е. к низким значениям в межклеточном пространстве и высоким — во внутриклеточном (цитоплазматическом) [49–51]. Кислая микросреда приводит, в числе прочего, к появлению кислотоустойчивых и инвазивных субпопуляций [52].

Может ли щелочной внутриклеточный рН (в диапазоне 7,12–7,65 [50]) быть причиной повы-

шения рН в просвете Гольджи? Сначала вкратце рассмотрим механизм, вызывающий эту смену метаболизма. Принимая во внимание текущие модели онкогенеза, которые предполагают, что первопричиной рака является последовательное накопление мутантных онкогенов и генов-супрессоров опухолей [53], необходимо выявить генетические изменения, вызывающие гликолиз. Поразительно, что в этот процесс могут быть вовлечены очень многие онкогены (например, *PI3K*, *Akt*, *HER2*, *EGFR*, *c-Myc*, *HRAS*) или выключенные гены-супрессоры опухолей (например, *PTEN*, *p53*, *SIRT3*, *VHL*) [49, 54]. Большинство из них также являются генами, регулирующими рост, и могут действовать либо попеременно, либо синергически. Один путь включает ионообменник Na^+/H^+ (NHE1) [55], который активируется несколькими онкогенами, такими как *HRAS*. Повышенной экспрессии NHE1 достаточно для обращения градиента рН в плазматической мембране. Кроме того, оно приводит к усилению аэробного гликолиза. В свою очередь, синтез лактата в процессе гликолиза активирует котранспортер $\text{H}^+/\text{лактат}$ (транспортер монокарбоксилата, МСТ), что приводит к дальнейшему повышению внутриклеточного рН [55]. В другом примере [56] инициация происходит благодаря сверхэкспрессии *c-Myc*, которая приводит к изменению паттерна экспрессии пируваткиназы (PKM) — ключевого фермента в регуляции метаболизма. PKM существует в виде двух изоферментов. Основной изофермент PKM1 образует устойчивые тетрамеры, которые направляют пируват в сторону окислительного фосфорилирования. *c-Myc*, однако, приводит к предпочтительной экспрессии PKM2, который в основном существует в виде димера и направляет метаболизм в сторону гликолиза. Кроме того, PKM2 создает положительную обратную связь для *c-Myc* [56]. *c-Myc* также индуцирует увеличение экспрессии лактатдегидрогеназы (LDH-A) [48]. В большинстве случаев переключение метаболизма на гликолиз координируется фактором транскрипции HIF-1 (индуцируемый гипоксией фактор 1) [57]. Его экспрессия повышается либо в условиях гипоксии (которая возникает уже в очень маленьких опухолях, таких как карциномы *in situ*), либо при онкогенезе или выключении генов-супрессоров опухолей, что происходит даже при нормальном содержании кислорода. В последнем случае он остается конститутивно активированным. HIF-1 состоит из двух субъединиц: HIF-1 α и HIF-1 β , первая из которых подвергается O_2 -зависимой деградации. Как конститутивная сверхэкспрессия HIF-1 α , так и инактивация супрессора опухоли VHL (белок фон Хиппель—Линдау, который принимает

участие в деградации) приводят к перманентному повышению уровня HIF-1. HIF-1 является многофункциональным фактором трансформации, действующим на сотни генов, преимущественно на гены, активные при гликолизе.

Можно также добавить, что искусственная генерация кислой внеклеточной среды без фонового изменения метаболизма приводит совсем к другим последствиям. Ее результатом является снижение рН цитоплазмы без изменения рН в аппарате Гольджи [58].

ПОСЛЕДСТВИЯ ДЛЯ рН В АППАРАТЕ ГОЛЬДЖИ

Результатом злокачественной трансформации в любом случае является повышение рН в цитоплазме опухолевых клеток. Можно предположить, что существует связь между увеличением рН цитозоля и повышением рН в люмене Гольджи в клетках опухолей. Вопрос состоит в том, может ли высокий рН цитозоля сам по себе привести к защелачиванию люмена Гольджи или же в процессе участвуют дополнительные медиаторы. В настоящий момент однозначного ответа на этот вопрос нет. Самым простым объяснением было бы предположить, что (уже существующий) отток протонов через мембрану Гольджи в этих условиях усиливается и не может быть скомпенсирован V-АТФазой. Этот эффект может потенциально усугубляться наблюдаемым увеличением объема люмена цистерны [37, 59]. С другой стороны, возможны также и изменения в активности протонного насоса Гольджи. Эксперименты с коровьим папилломавирусом E5 показывают, что нарушения активности V-АТФазы, вызванного ее связыванием с трансформирующим белком вируса, достаточно для создания щелочной среды в просвете Гольджи [60]. Активность V-АТФазы регулируется множеством путей. Одним из регуляторных элементов является ее зависимость от глюкозы [61]. Поскольку скорость обмена при гликолизе очень высока, уровень свободной глюкозы может быть низким. Мало что известно о регуляции недавно описанного регулятора рН Гольджи (GNHR) [45]. В заключение надо признать, что описанные варианты на настоящий момент являются всего лишь предположениями. Другими словами, до сих пор в наших знаниях о механизме, связывающем щелочной рН цитозоля в клетках опухоли с диссипированием рН-градиента в аппарате Гольджи, имеется «пропущенное звено».

Пример прямой связи между гипоксией и экспрессией TF приведен в работе, в которой

эксплантаты плаценты человека или иммортализованные цитотрофобласты подвергались воздействию среды с нормальным содержанием кислорода и гипоксией соответственно. В случае низкого содержания кислорода наблюдалась повышенная экспрессия как HIF-1 α , так и TF [15]. Однако следует иметь в виду, что трофобласты представляют собой очень необычный класс клеток [62].

ГИПОТЕЗА И ВЫВОД

Мы предполагаем, что экспрессия укороченных O-гликанов, а именно гликанов со структурой кор-1/TF, является (непрямым) маркером аэробного гликолиза. Это предположение основано на следующих фактах. Экспрессия TF связана с диссипированием градиента pH в аппарате Гольджи. В клетках опухоли регулярно наблюдается повышение значения pH в просвете Гольджи, которое приводит к изменению расположения определенных гликозилтрансфераз, в частности к диссоциации гетеромерного комплекса ферментов, необходимого для упорядоченного гликозилирования. Это приводит к некорректному и/или неполному гликозилированию O- и N-гликанов. В то же время цитозольный pH повышается в результате базовой смены метаболизма в клетках опухоли в сторону аэробного гликолиза, что является результатом генетических изменений, приводящих к злокачественности. Очевидно, существует практически полная цепочка причинно-следственных связей от изменения генов до специфических для рака структур гликанов.

Новые данные показывают, что субпопуляции опухолевых клеток с различными типами метаболизма глюкозы существуют одновременно друг с другом, демонстрируя либо чистый

гликолиз и окислительное фосфорилирование, либо гликолиз, сочетающийся с окислительным фосфорилированием в разных пропорциях [48]. Подобная гетерогенность согласуется с тем фактом, что экспрессия TF на клетках опухоли часто гетерогенна и, возможно, ограничена областями раковых стволовых клеток (CSC). Однако это требует обоснования в дополнительных исследованиях.

На некоторые вопросы пока нет ответа. Один из таких вопросов, как сказано выше, состоит в том, каким образом щелочной pH цитозоля (~7,4) реализует нейтрализацию pH в люмене Гольджи. Второй открытый вопрос: может ли экспрессия TF (и если да, то при каких обстоятельствах) происходить в местах *анаэробного* гликолиза в нишах нормальных стволовых клеток [63]. По-видимому, это не так, поскольку в большом числе иммуногистохимических анализов экспрессии TF на клетках человека эти области всегда TF-отрицательны. В-третьих, новые данные показывают, что HIF-1 из раковых клеток может перепрограммировать опухолеассоциированные фибробласты (CAFs) на гликолиз [64]. В свою очередь, эти клетки могут помогать опухолевым клеткам, снабжая их лактатом и другими метаболитами («обратный эффект Варбурга»). Неизвестно, может ли экспрессия TF возникать в этих обстоятельствах, и если да, то какие клетки этого типа метаболического симбиоза могут быть TF-положительными.

Антиген Томсена—Фриденрайха в качестве артефакта при определении группы крови — с одной стороны, и аэробное гликозилирование раковых клеток — с другой стороны были обнаружены практически одновременно около 90 лет назад в середине 20-х гг. прошлого столетия. Никто не мог тогда предположить, что между этими двумя явлениями может быть какая-то связь, но теперь представляется, что это именно так.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Friedenreich, V. (1930) The Thomsen hemagglutination phenomenon, *Levin & Munksgaard*, Copenhagen.
2. Kim, Z., and Uhlenbruck, G. (1966) Untersuchungen über T-Antigen und T-Agglutinin, *Z. Immunitätsforsch Allerg. Klin. Immunol.*, **130**, 88–99.
3. Springer, G.F., Desai, P.R., and Banatwala, I. (1975) Blood group MN antigens and precursors in normal and malignant human breast glandular tissue, *J. Natl. Cancer Inst.*, **54**, 335–339.
4. Springer, G.F. (1997) Immunoreactive T and Tn epitopes in cancer diagnosis, prognosis, and immunotherapy, *J. Mol. Med.*, **75**, 594–602.
5. Springer, G.F. (1984) T and Tn, general carcinoma autoantigens, *Science*, **228**, 1198–1206.
6. Cao, Y., Stosiek, P., Springer, G.F., and Karsten, U. (1996) Thomsen–Friedenreich-related carbohydrate antigens in normal adult human tissues: a systematic and comparative study, *Histochem. Cell Biol.*, **106**, 197–207.
7. Cao, Y., Karsten, U., Liebrich, W., Haensch, W., Springer, G.F., and Schlag, P.M. (1995) Expression of Thomsen–Friedenreich-related antigens in primary and metastatic colorectal carcinomas: a reevaluation, *Cancer*, **76**, 1700–1708.
8. Takanami, I. (1999) Expression of Thomsen–Friedenreich antigen as a marker of poor prognosis in pulmonary adenocarcinoma, *Oncol. Rep.*, **6**, 341–344.
9. Baldus, S.E., Hanisch, F.G., Monaca, E., Karsten, U., Zirbes, T.K., Thiele, J., and Dienes, H.P. (1999) Immunoreactivity

- of Thomsen–Friedenreich (TF) antigen in human neoplasms: the importance of carrier-specific glycotope expression on MUC1, *Histol. Histopathol.*, **14**, 1153–1158.
10. Cao, Y., Karsten, U., Otto, G., and Bannasch, P. (1999) Expression of MUC1, Thomsen–Friedenreich antigen, Tn, sialosyl-Tn, and 2,6-linked sialic acid in hepatocellular carcinomas and preneoplastic hepatocellular lesions, *Virchows Arch.*, **434**, 503–509.
 11. Veerman, A.J.P., Hogeman, P.H.G., Huismans, D.R., Van Zantwijk, C.H., and Bezemer, P.D. (1985) Peanut agglutinin, a marker for T-cell acute lymphoblastic leukemia with a good prognosis, *Cancer Res.*, **45**, 1890–1893.
 12. Karsten, U. (2002) CD176 Workshop Panel report, in *Leucocyte Typing VII* (Mason, D., ed.), Oxford University Press, Oxford, pp. 202–203.
 13. Karsten, U., and Goletz, S. (2013) What makes cancer stem cell markers different, *Springer Plus*, **2**, 301.
 14. Brockhausen, I., Yang, J., Burchell, J., Whitehouse, C., and Taylor-Papadimitriou, J. (1995) Mechanism underlying aberrant glycosylation of the MUC1 mucin in breast cancer, *Eur. J. Biochem.*, **233**, 607–617.
 15. Ermini, L., Bhattacharjee, J., Spagnoletti, A., Bechi, N., Aldi, S., Ferretti, C., Bianchi, L., Bini, L., Rosati, F., Paulesu, L., and Ietta, F. (2013) Oxygen governs Gal1-3GalNAc epitope in human placenta, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **305**, 931–940.
 16. Brockhausen, I. (1999) Pathways of O-glycan biosynthesis in cancer cells, *Biochim. Biophys. Acta*, **1473**, 67–95.
 17. Brockhausen, I. (2006) Mucin-type O-glycosylation in human colon and breast cancer: glycodynamics and functions, *EMBO Rep.*, **7**, 599–604.
 18. Goletz, S., Cao, Y., Danielczyk, A., Ravn, P., Schoeber, U., and Karsten, U. (2003) Thomsen–Friedenreich antigen: the «hidden» tumor antigen, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **535**, 147–162.
 19. Burchell, J.M., Mungul, A., and Taylor-Papadimitriou, J. (2001) O-linked glycosylation in the mammary gland: changes that occur during malignancy, *J. Mamm. Grand Biol. Neoplas.*, **6**, 355–364.
 20. Vavasseur, F., Yang, J., Dole, K., Paulsen, H., and Brockhausen, I. (1995) Synthesis of core 3: characterization of UDP-GlcNAc: GalNAc 3-N-acetylglucosaminyltransferase activity from colonic tissues. Loss of the activity in human cancer cell lines, *Glycobiology*, **5**, 351–357.
 21. Schneider, F., Kemmner, W., Haensch, W., Franke, G., Gretschel, S., Karsten, U., and Schlag, P.M. (2001) Overexpression of sialyltransferase CMP-sialic acid: Galbeta1,3GalNAc-R alpha6-sialyltransferase is related to poor patient survival in human colorectal carcinomas, *Cancer Res.*, **61**, 4605–4611.
 22. Dalziel, M., Whitehouse, C., McFarlane, I., Brockhausen, I., Gschmeissner, S., Schwientek, T., Clausen, H., Burchell, J.M., and Taylor-Papadimitriou, J. (2001) The relative activities of the C2GnT1 and ST3Gal-I glycosyltransferases determine O-glycan structure and expression of a tumor-associated epitope on MUC1, *J. Biol. Chem.*, **276**, 11007–11015.
 23. Gill, D.J., Tham, K.M., Chia, J., Wang, S.C., Steentoft, C., Clausen, H., Bard-Chapeau, E.A., and Bard, F.A. (2013) Initiation of GalNAc-type O-glycosylation in the endoplasmic reticulum promotes cancer cell invasiveness, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 3152–3162.
 24. Radhakrishnan, P., Dabelsteen, S., Madsen, F.B., Francavilla, C., Kopp, K.L., Steentoft, C., Vakhrushev, S.Y., Olsen, J.V., Hansen, L., Bennett, E.P., Woetmann, A., Yin, G., Chen, L., Song, H., Bak, M., Hlady, R.A., Peters, S.L., Opavsky, R., Thode, C., Qvortrup, K., Schjoldager, K.T.-B.G., Clausen, H., Hollingsworth, M.A., and Wandall, H.H. (2014) Immature truncated O-glycophenotype of cancer directly induces oncogenic features, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, 4066–4075.
 25. Ju, T., Otto, V.I., and Cummings, R.D. (2011) The Tn antigen – structural simplicity and biological complexity, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **50**, 1770–1791.
 26. Kumamoto, K., Goto, Y., Sekikawa, K., Takenoshita, S., Ishida, N., Kawakita, M., and Kannagi, R. (2001) Increased expression of UDP-galactose transporter RNA in human colon cancer tissues and its implication in synthesis of Thomsen–Friedenreich antigen and sialyl Lewis A/X determinants, *Cancer Res.*, **61**, 4620–4627.
 27. Nilsson, T., Slusarewicz, P., Hoe, M.H., and Warren, G. (1993) Kin recognition. A model for the retention of Golgi enzymes, *FEBS Lett.*, **330**, 1–4.
 28. De Graffenried, C.L., and Bertozzi, C.R. (2004) The roles of enzyme localization and complex formation of Golgi enzymes, *Curr. Opin. Cell Biol.*, **16**, 356–363.
 29. Engelsberg, A., Hermosilla, R., Karsten, U., Schulein, R., Dorken, B., and Rehm, A. (2003) The Golgi protein RCAS1 controls cell surface expression of tumor-associated O-linked glycan antigens, *J. Biol. Chem.*, **278**, 22998–23007.
 30. Egea, G., Franci, C., Gambus, G., Lesuffleur, T., Zweibaum, A., and Real, F.X. (1993) Cis-Golgi resident proteins and O-glycans are abnormally compartmentalized in the RER of colon cancer cells, *J. Cell Sci.*, **105**, 819–830.
 31. Sewell, R., Backstrom, M., Dalziel, M., Gschmeissner, S., Karlsson, H., Noll, T., Gatgens, J., Clausen, H., Hansson, G.C., Burchell, J., and Taylor-Papadimitriou, J. (2006) The ST6GalNAc-I sialyltransferase localizes throughout the Golgi and is responsible for the synthesis of the tumor-associated sialyl-Tn-glycan in human breast cancer, *J. Biol. Chem.*, **281**, 3586–3594.
 32. Rottger, S., White, J., Wandall, H.H., Olivo, J.-C., Stark, A., Bennett, E.P., Whitehouse, C., Berger, E.G., Clausen, H., and Nilsson, T. (1998) Localization of three human polypeptide GalNAc-transferases in HeLa cells suggests initiation of O-linked glycosylation throughout the Golgi apparatus, *J. Cell Sci.*, **111**, 45–60.
 33. Axelsson, M.A.B., Karlsson, N.G., Steel, D.M., Ouwendijk, J., Nilsson, T., and Hansson, G.C. (2001) Neutralization of pH in the Golgi apparatus cause redistribution of glycosyltransferases and changes in the O-glycosylation of mucins, *Glycobiology*, **11**, 633–644.
 34. Campbell, B.J., Rowe, G.E., Leiper, K., and Rhodes, J.M. (2001) Increasing the intra-Golgi pH of cultured LS174T goblet-differentiated cells mimics the decreased mucin sulfation and increased Thomsen–Friedenreich antigen (Gal1-3GalNAc-) expression seen in colon cancer, *Glycobiology*, **11**, 385–393.
 35. Thorens, B., and Vassalli, P. (1986) Chloroquine and ammonium chloride prevent terminal glycosylation of immunoglobulins in plasma cells without affecting secretion, *Nature*, **321**, 618–620.
 36. Caplan, M.J., Stow, J.L., Newman, A.P., Madri, J., Anderson, H.C., Farquhar, M.G., Palade, G.E., and Jamieson, J.D. (1987) Dependence on pH of polarized sorting of secreted proteins, *Nature*, **329**, 632–635.
 37. Kellokumpu, S., Sormunen, R., and Kellokumpu, I. (2002) Abnormal glycosylation and altered Golgi structure in colorectal cancer: dependence on intra-Golgi pH, *FEBS Lett.*, **516**, 217–224.
 38. Paroutis, P., Touret, N., and Grinstein, S. (2004) The pH of the secretory pathway: measurement, determinants, and regulation, *Physiology*, **19**, 207–215.
 39. Rivinoja, A., Kokkonen, N., Kellokumpu, I., and Kellokumpu, S. (2006) Elevated Golgi pH in breast and colorectal cancer cells correlates with the expression of

- oncofetal carbohydrate T-antigen, *J. Cell. Physiol.*, **208**, 167–174.
40. Gawlitzek, M., Ryll, T., Lofgren, J., and Sliwkowski, M.B. (2000) Ammonium alters N-glycan structures of recombinant TNFR-IgG: degradative versus biosynthetic mechanisms, *Biotechnol. Bioeng.*, **68**, 637–646.
 41. Rivinoja, A., Hassinen, A., Kokkonen, N., Kauppila, A., and Kellokumpu, S. (2009) Elevated Golgi pH impairs terminal N-glycosylation by inducing mislocalization of Golgi glycosyltransferases, *J. Cell. Physiol.*, **220**, 144–154.
 42. Hassinen, A., Pujol, F.M., Kokkonen, N., Pieters, C., Kihlstrom, M., Korhonen, K., and Kellokumpu, S. (2011) Functional organization of the Golgi N- and O-glycosylation pathways involves pH-dependent complex formation that is impaired in cancer cells, *J. Biol. Chem.*, **286**, 38329–38340.
 43. Hassinen, A., and Kellokumpu, S. (2014) Organizational interplay of Golgi N-glycosyltransferases involves organelle microenvironment-dependent transitions between enzyme homo- and heteromers, *J. Biol. Chem.*, **289**, 26937–26948.
 44. Rivinoja, A., Pujol, F.M., Hassinen, A., and Kellokumpu, S. (2012) Golgi pH, its regulation and roles in human disease, *Ann. Med.*, **44**, 542–554.
 45. Maeda, Y., Ide, T., Koike, M., Uchiyama, Y., and Kinoshita, T. (2008) GPHR is a novel anion channel critical for acidification and functions of the Golgi apparatus, *Nature Cell Biol.*, **10**, 1135–1145.
 46. Marshansky, V., Rubinstein, J.L., and Gruber, G. (2014) Eukaryotic V-ATPase: novel structural findings and functional insights, *Biochim. Biophys. Acta*, **1837**, 857–879.
 47. Warburg, O., Wind, F., and Negelein, E. (1927) The metabolism of tumors in the body, *J. Gen. Physiol.*, **8**, 519–530.
 48. Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011) Hallmarks of cancer: the next generation, *Cell*, **144**, 646–674.
 49. DeBerardinis, R.J., Lum, J.J., Hatzivassiliou, G., and Thompson, C.B. (2008) The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation, *Cell Metab.*, **7**, 11–20.
 50. Gillies, R.J., Raghunand, N., Karczmar, G.S., and Bhujwala, Z.M. (2002) MRI of the tumor microenvironment, *J. Magn. Reson. Imaging*, **16**, 430–450.
 51. Damaghi, M., Wojtkowiak, J.W., and Gillies, R.J. (2013) pH sensing and regulation in cancer, *Front. Physiol.*, **4**, 370.
 52. Gatenby, R.A., Smallbone, K., Maini, P.K., Rose, F., Averill, J., Nagle, R.B., Worrall, L., and Gillies, R.J. (2007) Cellular adaptations to hypoxia and acidosis during somatic evolution of breast cancer, *Br. J. Cancer*, **97**, 646–653.
 53. Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. (2004) Cancer genes and the pathways they control, *Nature Med.*, **10**, 789–799.
 54. Kroemer, G., and Pouyssegur, J. (2008) Tumor cell metabolism: cancer's Achilles heel, *Cancer Cell*, **13**, 472–482.
 55. Cardone, R.A., Casavola, V., and Reshkin, S.J. (2005) The role of disturbed pH dynamics and the Na⁺/H⁺ exchanger in metastasis, *Nature Rev. Cancer*, **5**, 786–795.
 56. Wong, N., De Melo, J., and Tang, D. (2013) PKM2, a central point of regulation in cancer metabolism, *Int. J. Cell Biol.*, **2013**, 242513.
 57. Semenza, G.L. (2013) HIF-1 mediates metabolic responses to intratumoral hypoxia and oncogenic mutations, *J. Clin. Invest.*, **123**, 3665–3671.
 58. Soonthornsit, J., Yamaguchi, Y., Tamura, D., Ishida, R., Nakakoji, Y., Osako, S., Yamamoto, A., and Nakamura, N. (2014) Low cytoplasmic pH reduces ER-Golgi trafficking and induces disassembly of the Golgi apparatus, *Exp. Cell Res.*, **328**, 325–339.
 59. Finley, L.W.S., Carracedo, A., Lee, J., Souza, A., Egia, A., Zhang, J., Teruya-Feldstein, J., Moreira, P.I., Cardoso, S.M., Clish, C.B., Pandolfi, P.P., and Haigis, M.C. (2011) SIRT3 opposes reprogramming of cancer cell metabolism through HIF destabilization, *Cancer Cell*, **19**, 416–428.
 60. Schapiro, F., Sparkowski, J., Adduci, A., Supryniewicz, F., Schlegel, R., and Grinstein, S. (2000) Golgi alkalization by the papillomavirus E5 oncoprotein, *J. Cell Biol.*, **148**, 305–315.
 61. Sautin, Y.Y., Lu, M., Gaugler, A., Zhang, L., and Gluck, S.L. (2005) Phosphatidylinositol 3-kinase-mediated effects of glucose on vacuolar H⁺-ATPase assembly, translocation, and acidification of intracellular compartments in renal epithelial cells, *Mol. Cell Biol.*, **25**, 575–589.
 62. Jeschke, U., Richter, D.U., Hammer, A., Briese, V., Friese, K., and Karsten, U. (2002) Expression of the Thomsen–Friedenreich antigen and of its putative carrier protein mucin 1 in the human placenta and in trophoblast cells *in vitro*, *Histochem. Cell Biol.*, **117**, 219–226.
 63. Ito, K., and Suda, T. (2014) Metabolic requirements for the maintenance of self-renewing stem cells, *Nature Rev. Mol. Cell Biol.*, **15**, 243–256.
 64. Martinez-Outschoorn, U.E., Lisanti, M.P., and Sotgia, F. (2014) Catabolic cancer-associated fibroblasts transfer energy and biomass to anabolic cancer cells, fueling tumor growth, *Semin. Cancer Biol.*, **25**, 47–60.

WHAT CONTROLS EXPRESSION OF CORE-1 (THOMSEN–FRIEDENREICH) GLYCOTOPE ON TUMOR CELLS?

U. Karsten, S. Goletz

*Glycotope GmbH, Robert-Rossle-Str. 10, D-13125 Berlin-Buch, Germany;
fax: +49-30-94892609, E-mail: uwe_karsten@gmx.de, steffen.goletz@glycotope.com*

Received February 1, 2015

Revision received March 23, 2015

Malignant transformation is tightly connected with changes in the glycosylation of proteins and lipids, which in turn contribute to invasive and metastatic behavior of tumor cells. One example of such changes is demasking of the otherwise hidden core-1 structure, also known as Thomsen–Friedenreich antigen, which is a highly tumor-specific glycotope and potentially a cancer stem cell marker. This review summarizes what is known about the mechanism(s) of its expression on tumor cells. New data reveal a close connection between tumor metabolism and Golgi function. Based on these data, we suggest that the expression of this antigen is also a marker of aerobic glycolysis.

Key words: glycosylation, Golgi, core-1, Thomsen–Friedenreich, glycolysis, tumor metabolism, pH