

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
ИНСТИТУТ БИОРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук

На правах рукописи

Шендер Виктория Олеговна

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ОМИКСНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ
ОСОБЕННОСТЕЙ КОММУНИКАЦИИ МЕЖДУ КЛЕТКАМИ
ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ**

Специальность 02.00.10 – «Биоорганическая химия»

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата химических наук

Москва – 2018

Работа выполнена в лаборатории протеомики Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук.

Научный руководитель:

Говорун Вадим Маркович, академик РАН, профессор, доктор биологических наук.

Официальные оппоненты:

Маргулис Борис Александрович, доктор биологических наук, главный научный сотрудник лаборатории защитных механизмов клетки Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт цитологии Российской академии наук (ИНЦ РАН).

Кантидзе Омар Леванович, доктор биологических наук, заведующий лабораторией стабильности генома Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биологии гена Российской академии наук (ИБГ РАН).

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение "Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Петрова" Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита диссертации состоится «10» октября 2018 г. в 10 часов на заседании диссертационного совета Д 002.019.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова Российской академии наук по адресу: 117997, ГСП-7, Москва В-437, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте (ibch.ru) Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биорганической химии им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова Российской академии наук.

Автореферат разослан «___» _____ 2018 г.

Учёный секретарь диссертационного совета,

доктор физико-математических наук

В.А. Олейников



ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Для большинства видов онкологических заболеваний человека весь внушительный арсенал лекарств так и не позволил добиться ощутимого прогресса в долгосрочной выживаемости пациентов. Одна из причин кроется в том, что опухоли легко развивают резистентность как к отдельным препаратам, так и к их комбинациям. Одним из хорошо известных примеров такой особенности онкотрансформированных клеток является возникновение резистентности опухолей яичника к препаратам группы платины. Несмотря на интенсивное лечение, пятилетняя выживаемость пациенток с аденокарциномой яичника не превышает 30%, и рецидив часто возникает уже через 5-6 месяцев после курса терапии. Причина этого заключается в том, что небольшое количество выживших после курсов химио- и радиотерапии опухолевых клеток быстро формирует новую опухоль, которая более не поддается действию препаратов, использованных ранее. Это явление хорошо описано в медицинской практике, однако, недостаточно изучено на молекулярном уровне.

Имеются данные, что погибающие в ходе терапии клетки могут секретировать во внеклеточную среду сигнальные молекулы, которые способствуют выживанию соседних клеток. Таким образом, для понимания причин возникновения резистентности опухолевых клеток к терапии, крайне важно учитывать роль межклеточной передачи сигналов, возникающей в ходе лечения.

Более чем у 70% пациенток к моменту диагностики рака яичника развивается асцит. Опухолевый асцит представляет собой излишнюю жидкость в брюшной полости и возникает в результате распространения опухолевых клеток с током внутрибрюшной жидкости с поверхности пораженного опухолью яичника по всей брюшной полости. Асциты наиболее ярко отражают нативный секретом многочисленных опухолевых клеток, в них присутствует большое количество факторов роста; липидов, некоторые из которых имеют доказанное регуляторное значение; внеклеточных везикул и других важных компонентов. Исследование асцитов, а также других компонентов среды обитания раковых клеток, является важной и интересной задачей, так как опухоль представляет собой очень сложный комплекс клеток, тесно взаимодействующий с окружающими тканями. По этой причине необходимо понимать, как раковые клетки взаимодействуют со своим локальным микроокружением при воздействии такого стрессового фактора, как химио- или радиотерапия. Таким образом, изучение секретомов раковых клеток до и после проведения курсов химиотерапии позволит выявить молекулы, потенциально ответственные за приобретение резистентности к противоопухолевым препаратам, что расширит понимание механизмов коммуникации раковых клеток, а также поможет предложить более эффективные методы лечения опухолевых заболеваний и их диагностики.

Цели и задачи работы. Целью настоящей работы являлось исследование влияния химиотерапии на межклеточную коммуникацию, способствующую возникновению резистентной к терапии популяции опухолевых клеток.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

- 1) Определить метаболомные и протеомные профили асцитов при аденокарциноме яичника и сравнить их с асцитами неопухолевого происхождения.
- 2) Определить изменение спектра белков и некодирующих РНК в секретах раковых клеток *in vivo* и *in vitro* в ответ на химиотерапию.
- 3) Оценить влияние секретомов опухолевых клеток *in vivo* и *in vitro* до и после химиотерапии на фенотип и поведение реципиентных раковых клеток.
- 4) Выявить потенциальных кандидатов, участвующих в межклеточной коммуникации после химиотерапии, и определить их роль в этом процессе с использованием синтетических аналогов.

Научная новизна и практическая ценность работы. Наше исследование позволило провести детальный анализ белков, содержащихся в асцитных жидкостях, полученных от пациенток с аденокарциномой яичника. Количество выявленных нами белков более чем в 3 раза превышало результаты, ранее опубликованные в литературе. Более того, в данной работе впервые было проведено сравнение асцитов опухолевой и не опухолевой этиологии, что позволило определить ряд новых онкоспецифичных белков. Результаты нашего исследования дали возможность по-новому взглянуть на секретом опухолевых клеток и впервые показать, что белки регуляторы сплайсинга, а также сплайсосомные малые ядерные РНК могут присутствовать во внеклеточном пространстве после химиотерапевтического воздействия. Высокую достоверность полученных нами данных обеспечивает тот факт, что в настоящей работе мы сравнивали парные образцы асцитов, полученные от одних и тех же пациенток до и после химиотерапии, а также подтвердили наши результаты с использованием клеточных культур *in vitro*.

Исследование функций секретомов опухолевых клеток показало, что молекулы, секретлируемые клетками под действием терапии, могут придавать соседним раковым клеткам более устойчивый и агрессивный мезенхимальный фенотип. Это явление было показано впервые для аденокарциномы яичника.

В заключение, мы исследовали молекулярный механизм действия секретомов опухолевых клеток на соседние раковые клетки. Мы впервые предположили, что эффект секретомов может частично обуславливаться наличием в них некодирующих РНК сплайсосомы. Чтобы подтвердить эту гипотезу, мы разработали новый подход к *in vitro* синтезу этих РНК и провели полнотранскриптомное секвенирование клеток-реципиентов после добавления к ним *in vitro* синтезированных некодирующих РНК сплайсосомы. Эти результаты впервые продемонстрировали важную роль экзогенных сплайсосомных РНК в изменении фенотипа раковых клеток.

Описанные выше результаты, помимо научного интереса, могут иметь также и существенную прикладную значимость для медицины. Во-первых, нами был выявлен ряд молекул (белков, РНК и метаболитов), которые можно рассматривать в качестве потенциальных прогностических онкомаркеров для оценки эффективности лечения рака

яичника, а также, возможно, и других онкологических заболеваний. Во-вторых, разработанный нами метод синтеза РНК позволяет минимизировать деградацию продукта и на порядок снизить активацию неспецифического иммунного ответа клеток-реципиентов в сравнении с РНК, синтезированными по стандартной методике, что позволяет изучать специфические функции экзогенных некодирующих РНК. Кроме того, нами был предложен новый механизм возникновения химио- и радиорезистентности опухолевых клеток. Создание ингибиторов этого механизма может дать существенное преимущество для лечения пациентов с поздними стадиями онкологических заболеваний.

Структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 142 страницах и состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов и их обсуждения, выводов, заключения, списка сокращений и списка литературы, включающего 222 ссылки, а также 7 приложений. Диссертация содержит 52 рисунка и 9 таблиц.

Личный вклад автора. Основные результаты были получены лично автором, либо при его непосредственном участии. Автор осуществлял планирование и проведение экспериментов, выбор методов, анализ и подготовку результатов к публикации.

Связь работы с научными программами.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проекты №16-04-01414-а и №16-04-01209-а), РФФИ (проект № 17-75-20205), стипендии Президента РФ (СП-4811.2018.4).

Апробация работы. Результаты работы представлены на 12 российских и международных конференциях: The 38th FEBS Congress (Санкт-Петербург, 2013); The 39th FEBS EMBO (Париж, Франция, 2014); Международная конференция ИБХ по биоорганической химии, биотехнологии и бионанотехнологии (Москва, 2014); The 13th Human Proteome Organization World Congress HUPO (Мадрид, Испания, 2014); VI Международная научно-практическая конференция «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине» (Казань, 2014); VII Российский Симпозиум «Белки и Пептиды» (Новосибирск, 2015); The 14th Human Proteome Organization World Congress (HUPO) (Ванкувер, Канада, 2015); Experimental Biology Meeting (Сан-Диего, США, 2016); EMBL Symposium «Complex Life of mRNA» (Хайдельберг, Германия, 2016); Proteomic Forum (Потсдам, Германия, 2017); The 42th FEBS Congress (Иерусалим, Израиль, 2017); VIII Российский Симпозиум «Белки и Пептиды» (Москва, 2017).

Публикации. По теме диссертационной работы опубликовано 5 статей в рецензируемых российских и международных журналах.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1 Изучение асцитов как среды для межклеточной коммуникации

Рак яичника характеризуется ранним трансцеломическим метастазированием в брюшную полость с током перитонеальной жидкости, что приводит к образованию асцита. Так, преимущественно раковые клетки и небольшой процент опухоль-ассоциированных иммунных клеток создают уникальное микроокружение, способствующее прогрессии рака, возникновению химиорезистентности и подавлению иммунной системы. Асциты наиболее ярко отражают нативный секретом многочисленных опухолевых клеток, в них присутствует большое количество факторов роста, липидов, внеклеточных везикул и других важных компонентов. Однако основные механизмы, лежащие в основе межклеточной коммуникации, остаются неизвестными. Знание состава асцитов может дать важную информацию о факторах, определяющих рост и прогрессию рака яичника, а изучение секретомов клеток рака яичника до и после курсов химиотерапии (ХТ), позволит выявить молекулы, потенциально ответственные за приобретение резистентности к противоопухолевым препаратам. Однако, помимо молекул, секретируемых опухолевыми клетками, в асците присутствует большое количество белков плазмы крови и других компонентов, секретируемых нормальными тканями. Чтобы исключить из рассмотрения компоненты, относящиеся к системному ответу на образование асцита, не имеющие отношения к опухолевым клеткам, в качестве контрольных образцов были взяты асциты, образующиеся при портальном алкогольном циррозе.

1.1 Метаболомный анализ опухолевых асцитов и асцитов от пациенток с циррозом

Для того, чтобы выявить различия в представленности метаболитов между асцитами при аденокарциноме яичника и асцитами пациенток с портальным алкогольным циррозом, мы воспользовались масс-спектрометрией, совмещенной с газовой хроматографией. Анализ был проведен для 7 образцов индивидуальных опухолевых асцитов и 4 образцов индивидуальных асцитов от пациенток с циррозом в трех технических повторах.

В результате анализа метаболитов было идентифицировано 129 соединений. Метод главных компонент (*principal component analysis*, PCA) продемонстрировал четкое разделение между опухолевыми асцитами и асцитами от пациенток с циррозом (Рис.1А). Статистически значимо отличался 41 компонент, при этом более одной трети метаболитов было идентифицировано исключительно в опухолевых асцитах. Наиболее важные отличия были обнаружены в представленности жирных кислот, холестерина, церамида, глицерол-3-фосфата, глюкозы и глюкозо-3-фосфата.

Пониженные уровни глюкозы в опухолевых асцитах относительно асцитов от пациенток с циррозом могут быть ассоциированы с эффектом Варбурга. Суть этого эффекта заключается в сдвиге функций митохондрий с производства энергии на создание интермедиатов для биосинтеза. Это предположение косвенно подтверждается тем, что в наших протеомных данных был идентифицирован белок трансглутаминаза 2 (TGM2),

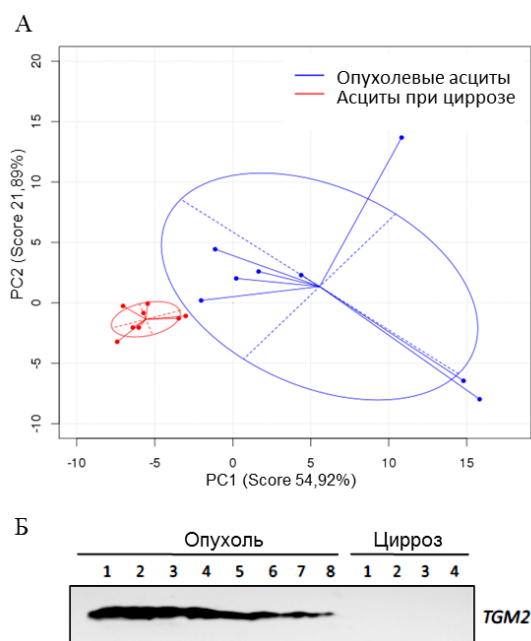


Рис. 1 – А, Метод главных компонент всех идентифицированных метаболитов (n=89) отражает значительную разницу между опухолевыми асцитами (синий цвет) и асцитами от пациенток с циррозом (красный цвет); Б, Представленность трансглутаминазы 2 (TGM2) в опухолевых асцитах и асцитах при циррозе, определенная методом иммуноблота.

детектируемый исключительно в опухолевых образцах (Рис.1Б). Ранее было показано, что абберантная экспрессия TGM2 является важным регулятором эффекта Варбурга в эпителиальных клетках.

Производные жирных кислот (холестерин, церамид (18:1), моноацилглицерол (18:0/0:0/0:0), лизофосфатидиловая кислота (16:0), амиды жирных кислот) значительно отличали опухолевые асциты от асцитов, возникших при циррозе. Изобилие этих компонентов может приводить к увеличению количества липидов с различными сигнальными функциями, которые могут вносить важный вклад в развитие опухоли.

1.2 Протеомный анализ опухолевых асцитов и асцитов от пациенток с циррозом

Нами был проведен сравнительный анализ протеомов асцитов пациенток с диагнозом рак яичника и асцитов пациенток с портальным алкогольным циррозом. Протеомный анализ асцитов проводился в трех повторах с использованием пула из 10 опухолевых асцитов и пула из 5 асцитов от пациенток с портальным алкогольным циррозом (Рис.2).

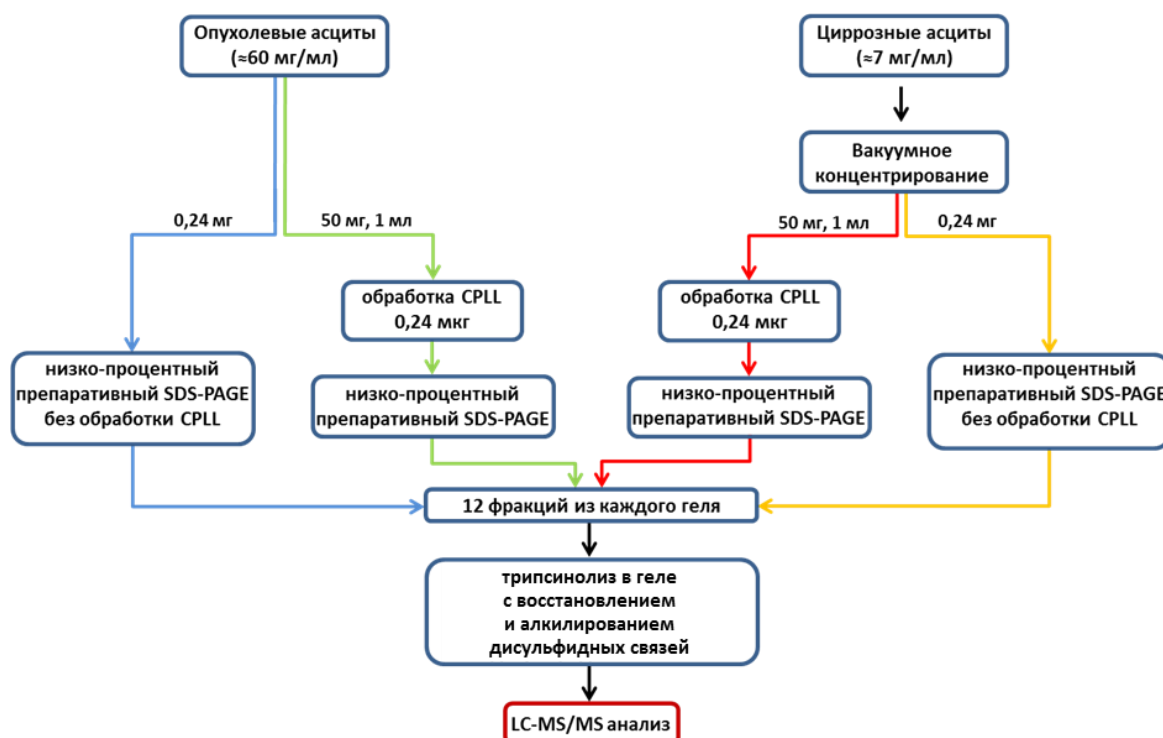


Рис. 2 – Схема фракционирования асцитов от пациенток с аденокарциномой яичника и асцитов от пациенток с циррозом перед их масс-спектрометрическим анализом.

Протеом асцитов, так же, как и протеом сыворотки крови, содержит большое количество мажорных белков, которые могут составлять 65–97% от доли всех белков в образце. Большой динамический диапазон концентраций белков в этих биологических жидкостях (более 10 порядков величин) серьезно затрудняет их протеомный анализ. Для решения этой проблемы используют различные методы предварительного фракционирования исследуемого материала перед LC-MS/MS анализом. Чтобы уменьшить динамический диапазон концентраций белков в асцитах, мы разработали собственную схему фракционирования. Были использованы комбинаторные гексапептидные лигандные библиотеки (*combinatorial peptide ligand library*, CPLL) с последующим разделением выделенных белков электрофорезом в низкопроцентном полиакриламидном геле (SDS-PAAG). Поскольку обработка образцов CPLL приводит к потере некоторых белков, также было произведено фракционирование образцов в SDS-PAAG без их предварительной обработки CPLL. Далее, белковые фракции подвергали восстановлению и алкилированию дисульфидных связей с последующим трипсинолизом в геле и LC-MS/MS анализом (Рис.2).

Таким образом, нами было идентифицировано 2096 белков в опухолевых асцитах, что в несколько раз превышает количественные показатели опубликованных ранее данных (а именно, 229 белков (Gortzak-Uzan, 2008), 445 белков (Kuk, 2009), и 484 белков (Drabovich, 2010)). Распределение белков, идентифицированных в опухолевых асцитах и асцитах от пациенток с циррозом для каждого эксперимента, представлено на Рис.3.

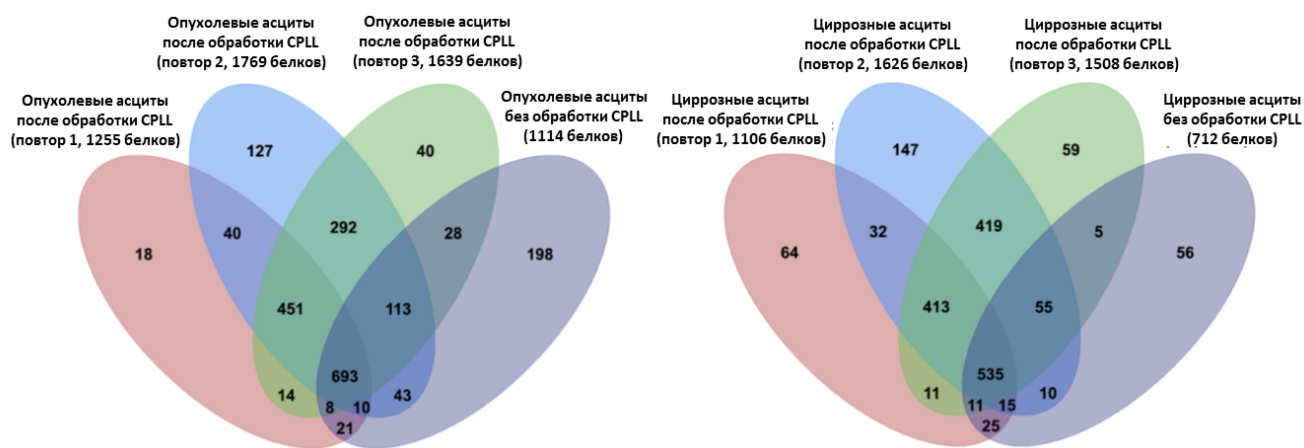


Рис. 3 – Распределение белков, идентифицированных в опухолевых асцитах (левая панель) и асцитах от пациенток с циррозом (правая панель) в индивидуальных экспериментах (с и без обработки CPLL).

При сравнении списков белков опухолевых асцитов, асцитов от пациенток с доброкачественными новообразованиями (Elschenbroich, 2011) и асцитов от пациенток с циррозом нам удалось выявить белки, специфичные для опухолевых асцитов и удалить из рассмотрения белки, относящиеся к системному ответу на образование асцита. В общей сложности, эта стратегия позволила выявить 424 белка (Рис.4А), специфичного для опухолевых асцитов. Данные LC-MS/MS анализа для нескольких белков были подтверждены методом Вестерн-блота (Рис.1Б, 4Б).

Анализ списка белков, специфичных для опухолевых асцитов, при помощи баз данных UniProtKB, NCBI и ECHOcarta показал, что большинство из них потенциально могут быть

секретируемыми: 34% приходится на белки внеклеточного пространства и 40% были обнаружены ранее в составе внеклеточных везикул (Рис.5А).

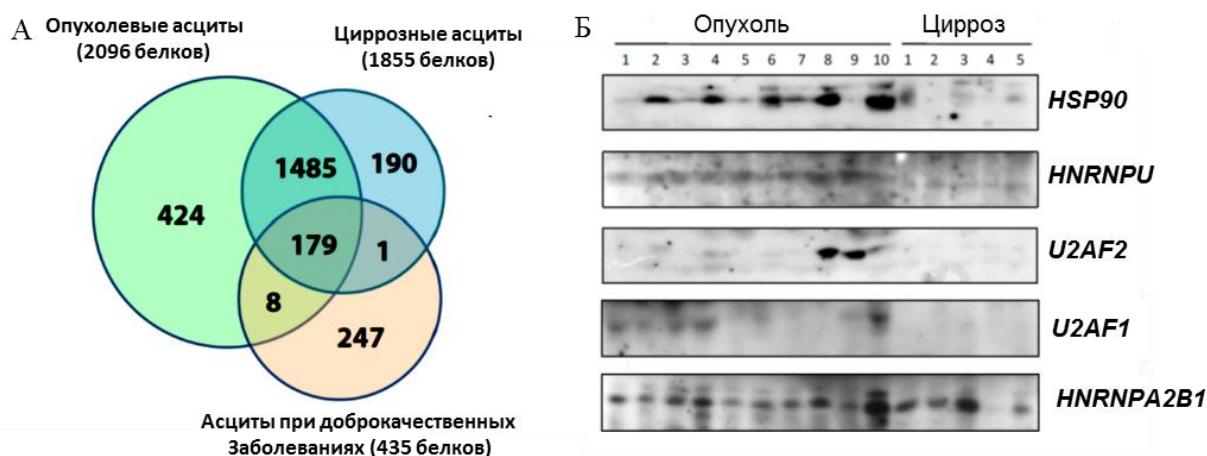


Рис. 4 – А, Сравнительный анализ протеомов опухолевых асцитов (зеленая окружность), асцитов от пациенток с циррозом (синяя окружность) и асцитов при доброкачественных новообразованиях (розовая окружность); Б, Представленность белков HSP90, HNRNPU, U2AF2, U2AF1 и HNRNPA2/B1 в опухолевых асцитах и в асцитах от пациенток с циррозом, определенная методом иммуноблота.

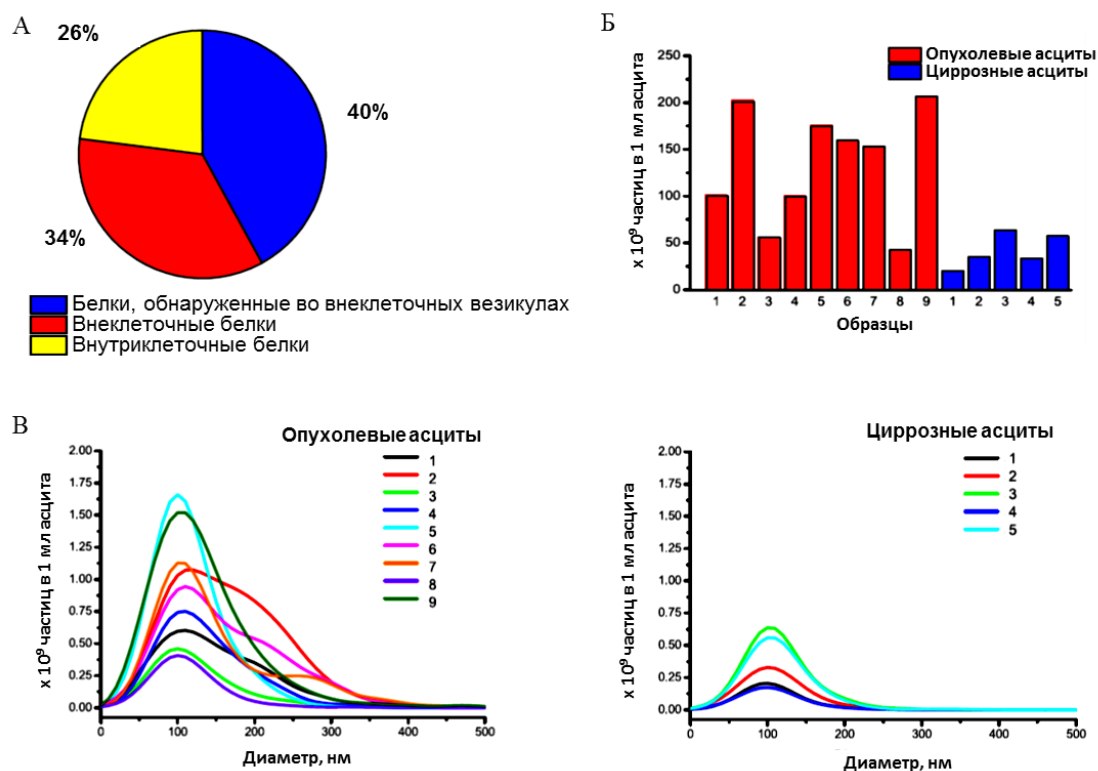


Рис. 5 – А, Локализация белков, уникальных для опухолевых асцитов: внеклеточные белки, внутриклеточные белки и белки, обнаруженные в составе внеклеточных везикул (микровезикул и экзосом). Б, количество экзосом, выделенных из опухолевых асцитов и асцитов от пациенток с циррозом. В, распределение по размеру экзосом, выделенных из опухолевых асцитов (левая панель) и асцитов от пациенток с циррозом (правая панель).

Повышенное количество экзосомальных белков в опухолевых асцитах может быть связано с увеличенной продукцией экзосом раковыми клетками. Чтобы проверить эту гипотезу, мы использовали метод анализа треков наночастиц (*nanoparticle tracking analysis*, NTA) для подсчёта экзосом в опухолевых и циррозных образцах. Как видно из рис.5Б-В,

количество везикул, выделенных из опухолевых асцитов, значительно превышает количество везикул в циррозных образцах, что хорошо согласуется с нашими протеомными данными.

На следующем этапе мы провели количественный анализ белков, идентифицированных в образцах асцитов опухолевого и циррозного происхождения с помощью метода “total spectral count”. PCA анализ LC-MS/MS данных выявил четкую дифференциацию, разделив исследованные образцы на две основные группы: опухоль и цирроз (Рис.6).

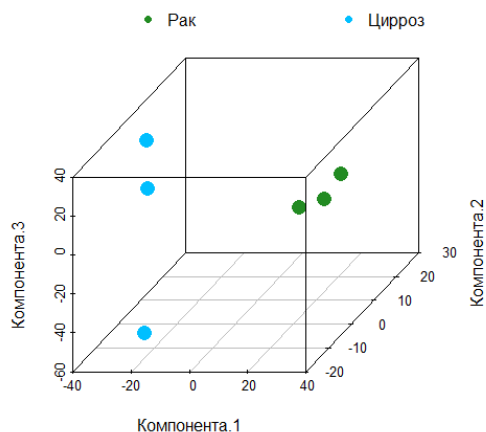


Рис. 6 – Метод главных компонент всех идентифицированных белков отражает значительные различия между опухолевыми асцитами и асцитами от пациенток с циррозом.

Функциональная аннотация белков с повышенной представленностью в опухолевых асцитах продемонстрировала, что кластер белков сплайсосомы был наиболее значимо представлен в опухолевых асцитах по сравнению с асцитами от пациенток с циррозом (Рис.7).

Эти данные представляют особый интерес, так как, известно, что в опухолевых клетках процесс сплайсинга существенно изменен по сравнению с нормальными клетками.

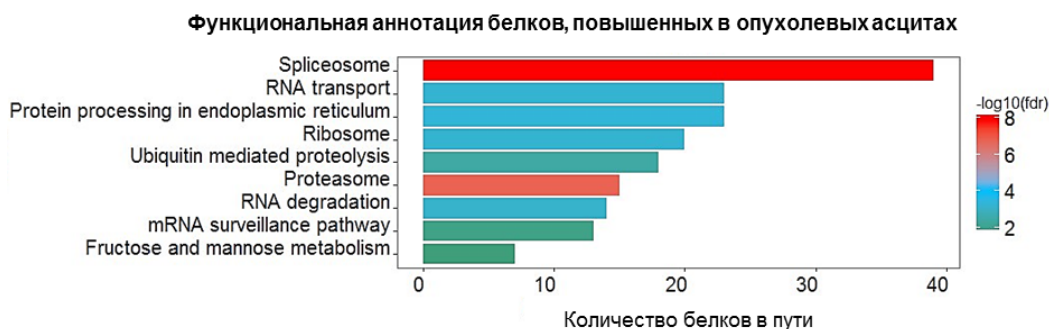


Рис. 7 – Статистически значимые ($p < 0,05$) кластеры белков, дифференциально повышенных в образцах опухолевых асцитов по сравнению с асцитами при циррозе. Данные обогащения получены с использованием базы данных KEGG.

Чтобы узнать, как изменяется секреция раковых клеток в условиях *in vivo* под действием химиотерапии, нами была получена уникальная коллекция парных асцитов от одних и тех же пациенток до и после курсов ХТ. Для этого мы воспользовались обработкой асцитов CPLL перед LC-MS/MS анализом, после чего был проведен количественный анализ белков, идентифицированных в двух технических повторах, между тремя парами асцитов до и после нескольких курсов неoadъювантной ХТ. В целом, нами было идентифицировано 1775 белков в опухолевых асцитах. Далее, мы сравнили списки белков опухолевых асцитов до и после ХТ, и асцитов от пациенток с циррозом (Рис.8). Нам удалось выявить 504 белка, появившихся в опухолевых асцитах исключительно после химиотерапии. Функциональная аннотация с помощью базы данных GO показала, что эти уникальные белки преимущественно относятся к процессу сплайсинга.

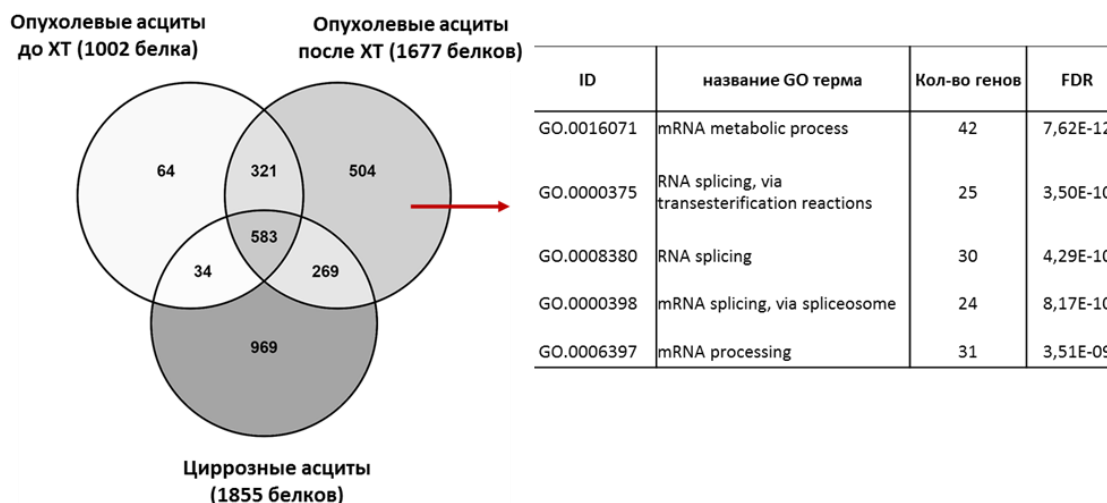


Рис. 8 – Сравнительный анализ протеомов асцитов при раке яичников до и после курсов неoadъювантной химиотерапии (ХТ), и асцитов при циррозе.

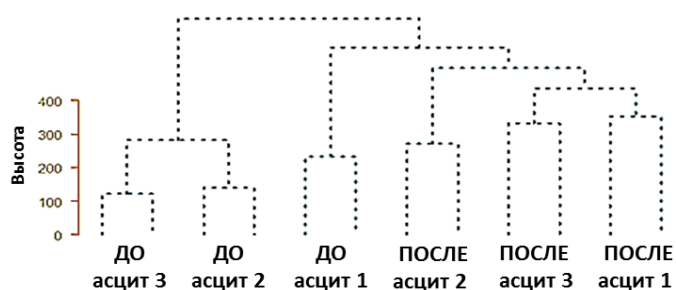


Рис. 9 – Древоидная кластеризация по идентифицированным белкам асцитов до и после ХТ.

После проведения древоидной кластеризации оказалось, что опухолевые асциты кластеризуются не по индивидуальным пациентам, что было ожидаемо, а по тому, был ли асцит отобран до или после терапии (Рис.9). Таким образом, можно сделать вывод о том, что ХТ вызывает существенное изменение состава

асцитов, и эти изменения сходны в образцах, полученных от всех пациенток.

Важно отметить, что, насколько нам известно, ранее среди опубликованных работ не было показано, что сплайсосомные белки могут быть экспортированы опухолевыми клетками во внеклеточное пространство после стрессового воздействия.

Сплайсосома представляет собой высоко динамичную структуру и состоит из нескольких рибонуклеопротеиновых комплексов, которые, в свою очередь, содержат ряд малых ядерных некодирующих РНК (мяРНК) и около 200 белков. В настоящее время известны два типа сплайсосом: мажорная (U2 тип), в состав которой входят U1, U2, U4, U5, и U6 мяРНК, и минорная (U12 тип) в состав которой входят U11, U12, U4atac, U5, и U6atac мяРНК. Хотя мяРНК отличаются между двумя типами сплайсосом, они ассоциированы преимущественно с одними и теми же белками. Однако, недавно было показано, что U2 и U6 мяРНК сами по себе (без ассоциации с белками) способны катализировать реакцию сплайсинга (Valadkhan, 2007). Функция этого большого комплекса сплайсосомы заключается в вырезании интронов и «сшивании» экзонов в пре-мРНК. Но, в зависимости от белков, которые в данный момент времени входят в состав сплайсосомы, экзоны могут сшиваться по-разному. Это может приводить к появлению новых изоформ белков – такой процесс называется альтернативным сплайсингом. Нарушение в регуляции сплайсинга может провоцировать метастазирование, а также приводить к возникновению устойчивости к химиотерапии (Pagliarini, 2015).

Обнаружив по результатам протеомного анализа наибольшие различия в представленности белков, относящихся к процессу сплайсинга, мы решили проверить наличие всех сплайсосомных мяРНК в исследуемых образцах асцитов. Оказалось, что именно в опухолевых асцитах присутствуют не только белки, относящиеся к сплайсингу, но также и все сплайсосомные мяРНК. Более того, представленность этих мяРНК в асцитах после ХТ значительно возросла (Рис.10), что хорошо согласуется с данными протеомного анализа, в которых одно из самых значимых отличий между асцитами до и после ХТ наблюдалось для белков сплайсосомы.

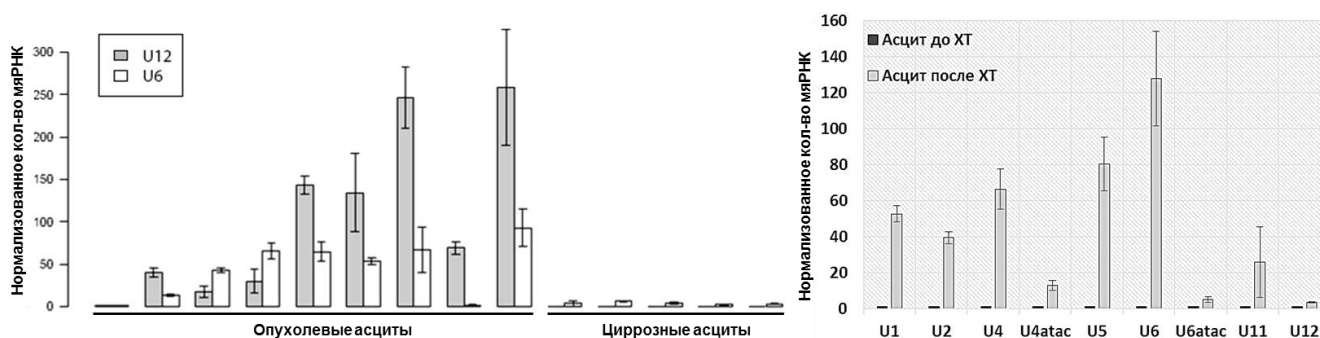


Рис. 10 – Данные ОТ-ПЦР анализа мяРНК сплайсосомы в опухолевых асцитах относительно асцитов от пациенток с циррозом (левая панель) и в опухолевых асцитах до и после курса неoadъювантной ХТ. Полученные данные были нормализованы на искусственно синтезированный стандарт – фрагмент GFP (89 нк).

На следующем этапе мы исследовали, как опухолевые асциты после ХТ могут влиять на фенотип и поведение раковых клеток. Для этого были получены три первичные культуры клеток рака яичника. Эти клеточные культуры были инкубированы с аутологичными асцитными жидкостями пациенток до и после ХТ, после чего клетки обрабатывали цисплатином. С помощью МТТ теста было выяснено, что асцитные жидкости именно после ХТ значимо увеличивают устойчивость опухолевых клеток к последующему действию препарата (Рис.11А). Кроме того, мы показали, что опухолевые асцитные жидкости после ХТ повышали подвижность раковых клеток (Рис.11Б), а также значительно усиливали экспрессию мезенхимального N-cadherin и понижали экспрессию эпителиального E-cadherin (рис.11В).

Известно, что сплайсинговые факторы, идентифицированные в опухолевых асцитах после ХТ, могут индуцировать эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП), провоцируя переключение с изоформ, характерных для эпителиального фенотипа, на сплайс-изоформы, характерные для мезенхимального фенотипа. Важно, что способность этих факторов связываться с элементами пре-мРНК зависит от их представленности и активности. В связи с этим, мы проверили, могут ли асциты после ХТ, приводить к изменению альтернативного сплайсинга генов, которые задействованы в ЭМП. Оказалось, что опухолевые асциты после ХТ действительно повышали представленность характерных для мезенхимального фенотипа сплайс-изоформ генов CCND1, ENAH и CD44 по сравнению с контрольными клетками (Рис.11Г). Эти результаты демонстрируют, что опухолевые асциты после ХТ вносят значимый вклад в приобретение раковыми клетками более агрессивного мезенхимального фенотипа.

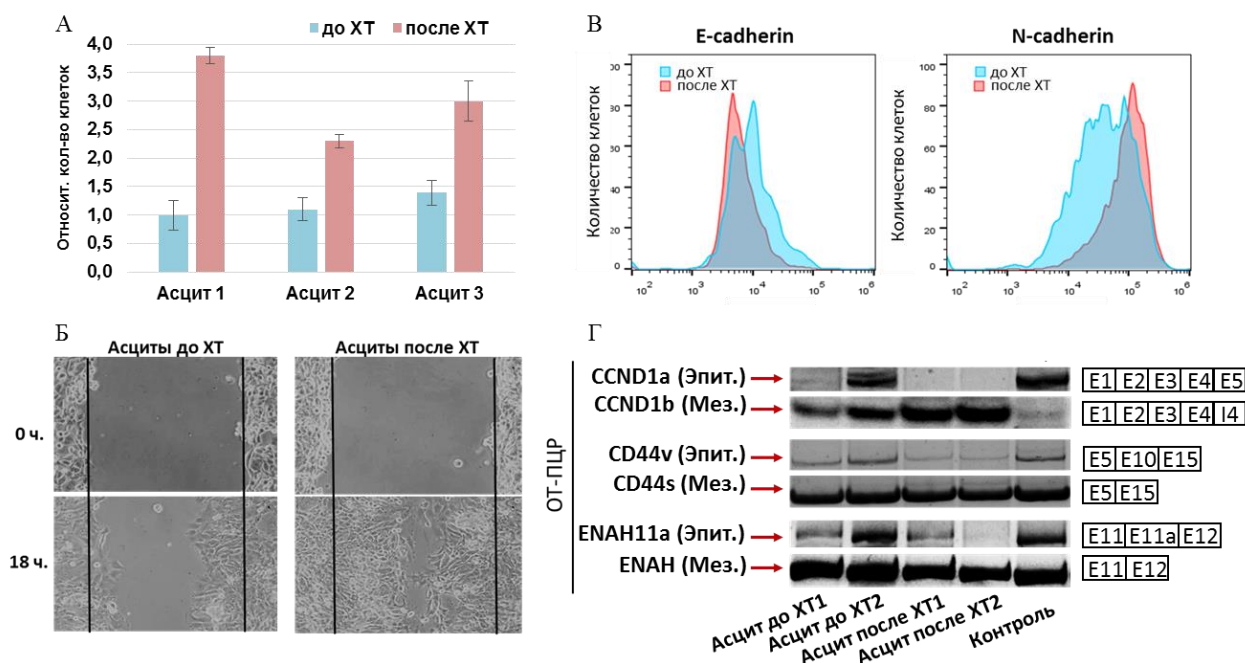


Рис. 11 – А, Выживаемость первичных культур клеток рака яичника, прединкубированных с опухолевыми асцитными жидкостями до и после ХТ и обработанных цисплатином. Представлено среднее значение МТТ-индекса относительно контрольных необработанных асцитными жидкостями клеток \pm стандартное отклонение, рассчитанное по данным шести измерений. Б, Оценка подвижности первичных культур клеток рака яичника, инкубированных с опухолевыми асцитными жидкостями до и после ХТ. В, Цитофлуориметрический анализ поверхностных маркеров E- и N-cadherin первичных культур клеток рака яичника, инкубированных с опухолевыми асцитными жидкостями до и после ХТ. Г, ПЦР анализ сплайс-изоформ генов CCND1, CD44 и ENAH в первичных культурах клеток рака яичника, инкубированных с опухолевыми асцитными жидкостями до и после ХТ; справа представлено схематичное изображение транскриптов, где указаны номера экзонов (E – экзон; I – интрон; Эпит. – эпителиальная изоформа; Мез. – мезенхимальная изоформа).

2. Секреты раковых клеток *in vitro*

Следующий этап работы был необходим для подтверждения полученных результатов на гомогенных клеточных культурах *in vitro*, чтобы убедиться, что выявленные нами компоненты опухолевых асцитов действительно секретируются раковыми клетками.

Мы исследовали, может ли секретом от апоптотических раковых клеток защищать клетки от последующего действия химиопрепарата. Для этого мы инкубировали клетки рака яичника линии SKOV3 с кондиционными средами от опухолевых клеток, обработанных или не обработанных цисплатином. При исследовании эффекта кондиционированной среды на реципиентные клетки мы показали, что прединкубация с 24- и 48-часовой кондиционными средами значимо повышала устойчивость клеток SKOV3 к последующему действию цисплатина (Рис.12А), а также усиливала подвижность реципиентных раковых клеток (Рис.12Б). Аналогичный результат был получен на клетках глиобластомы после инкубации их с кондиционными средами клеток после ионизирующего излучения. При этом, индуцированные ХТ секреты не опухолевых клеток (первичных фибробластов кожи) не оказывали защитного эффекта ни на раковые, ни на нормальные реципиентные клетки.

Эти результаты подтверждают тот факт, что раковые клетки и в условиях *in vitro* в ответ на терапевтический стресс секретируют факторы, которые поддерживают выживание

реципиентных опухолевых клеток и, таким образом, вносят вклад в приобретение резистентности.

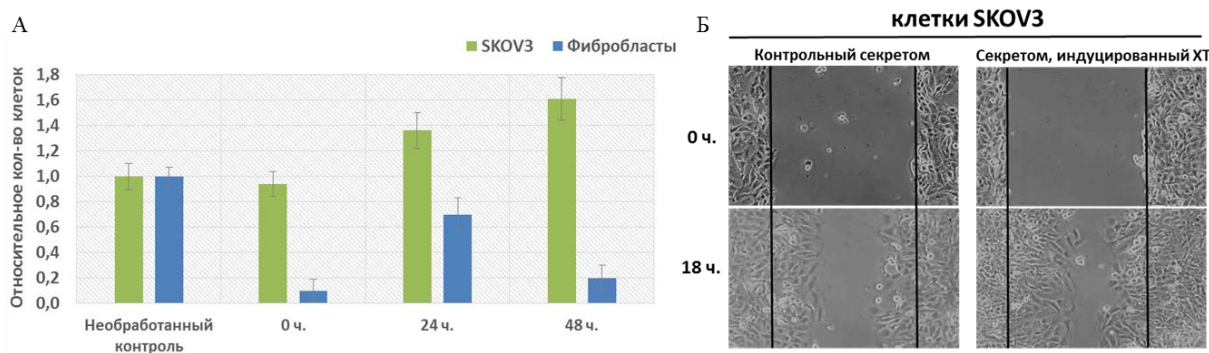


Рис. 12 – **А**, Выживаемость реципиентных клеток SKOV3 и первичных культур фибробластов, прединкубированных с и без кондиционных сред (3 суток) и обработанных цисплатином (2 суток). Представлено среднее значение МТТ-индекса относительно контрольных необработанных кондиционными средами клеток \pm стандартное отклонение, рассчитанное по данным шести измерений. **Б**, Оценка подвижности клеток рака яичника SKOV3, инкубированных с контрольными секретами и секретами от апоптотических клеток.

Далее, был проведен протеомный анализ кондиционных сред от клеток рака яичника SKOV3 до и после обработки цисплатином, и от первичных культур клеток глиобластомы до и после ионизирующего излучения (Рис.13А-Б).



Рис. 13 – Сравнительный анализ протеомов кондиционных сред от клеток SKOV3 (А) клеток глиобластомы (Б) до (розовая окружность) и после (синяя окружность) обработки цисплатином и ионизирующим излучением, соответственно.

Функциональная аннотация белков с повышенной представленностью в секретах после терапии продемонстрировала, что самые значимые отличия наблюдались для кластера белков сплайсосомы (Рис. 14) в секретах обеих клеточных линий после действия цисплатина и ионизирующего излучения.

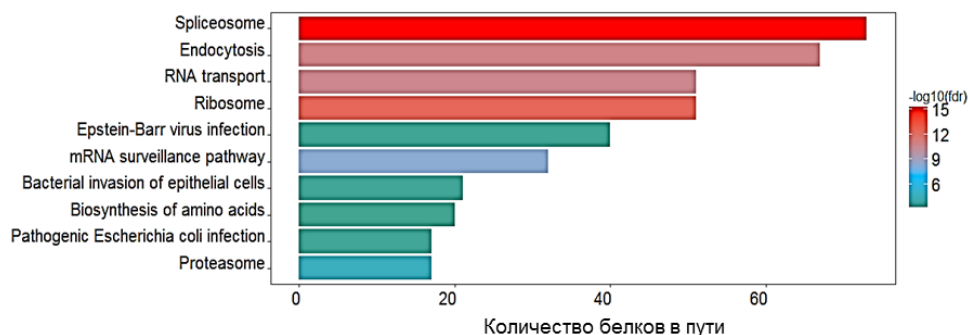


Рис. 14 – Статистически значимые ($p < 0,05$) кластеры белков, дифференциально повышенных в секретах клеток SKOV3 после действия цисплатина. Данные обогащения получены с использованием базы данных KEGG.

Интересно, что, несмотря на различные клеточные системы (*in vitro* и *in vivo*) и различные схемы ХТ, мы обнаружили значительное перекрытие между секретами клеток рака яичника SKOV3 и внеклеточной частью опухолевых асцитов. Общие белки (304 белка), дифференциально повышенные в представленности после ХТ, относились преимущественно к кластерам белков сплайсосомы и протеасомы. Эти данные указывают на то, что секреты от регрессирующих опухолей являются ответной реакцией на ХТ и содержат схожие секретируемые факторы, которые способны стимулировать раковые клетки.

Кроме того, количественная ОТ-ПЦР показала повышенные уровни всех сплайсосомных мяРНК в секретах клеток SKOV3 после цисплатина (Рис.15А). Были проанализированы отдельно фракции микровезикул, экзосом и супернатанта. Видно, что мяРНК детектировались во всех фракциях, что согласуется с данными, полученными на асцитах. Так же были проанализированы все мяРНК во внеклеточных везикулах от клеток глиобластомы после действия ионизирующего излучения или цисплатина. Видно, что после облучения, в экзосомах так же резко увеличивается представленность всех мяРНК (Рис.15Б).

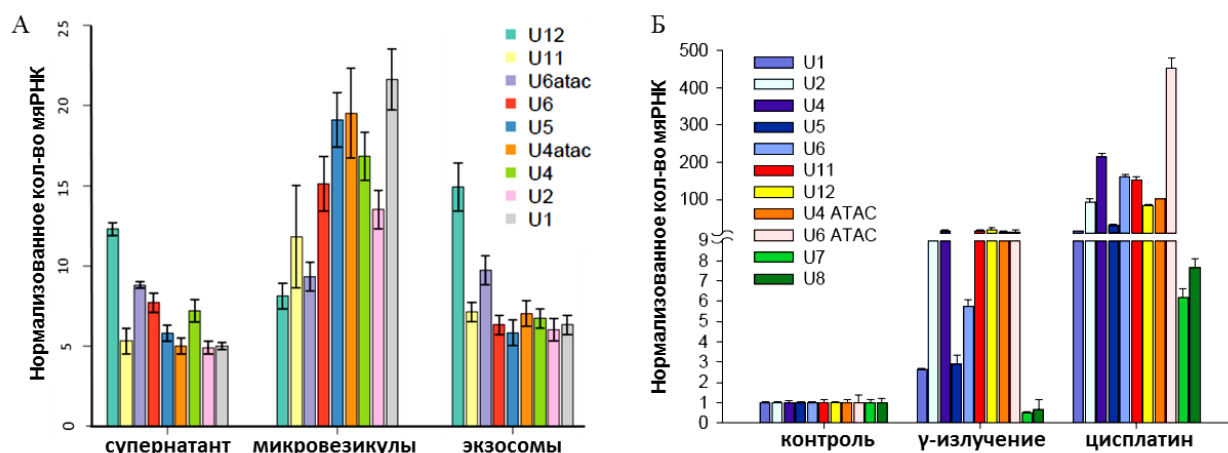


Рис. 15 – А, Данные ОТ-ПЦР анализа мяРНК в различных фракциях секретомов клеток SKOV3 после действия цисплатина относительно контрольных необработанных клеток. Полученные данные были нормализованы на искусственно синтезированный стандарт – фрагмент GFP89. Б, Данные ОТ-ПЦР анализа мяРНК во внеклеточных везикулах (микровезикулы + экзосомы), выделенных из секретомов клеток глиобластомы после действия ионизирующего излучения или цисплатина. Полученные данные были нормализованы по 18S рРНК, GAPDH или количеству тотальной РНК, все типы нормализации дали схожие результаты.

Чтобы исследовать, является ли секреция сплайсосомных белков при индукции апоптоза свойством лишь опухолевых клеток или аналогичный феномен характерен и для нормальных тканей, мы провели протеомный анализ секретомов первичной культуры нормальных дермальных фибробластов до и после обработки цисплатином. LC-MS/MS анализ секретомов раковых клеток и фибробластов после действия ХТ показал различные протеомные профили (Рис.16). При нормальных условиях примерно половина белков в секретомов фибробластов и раковых клеток пересекаются. На Рис.16 хорошо видно, что после воздействия химиопрепарата, репертуар белков, секретируемых раковыми клетками, становится разнообразнее и значительно отличается от секретомов фибробластов. После обогащения по базам данных метаболических путей, в секретомов раковых клеток после ХТ

наиболее значимо отличались белки, относящиеся к процессу сплайсинга (Рис.16). Кроме того, данные ОТ-ПЦР показали, что мяРНК отсутствовали в секретах фибробластов как до, так и после обработки цисплатином (данные не представлены).

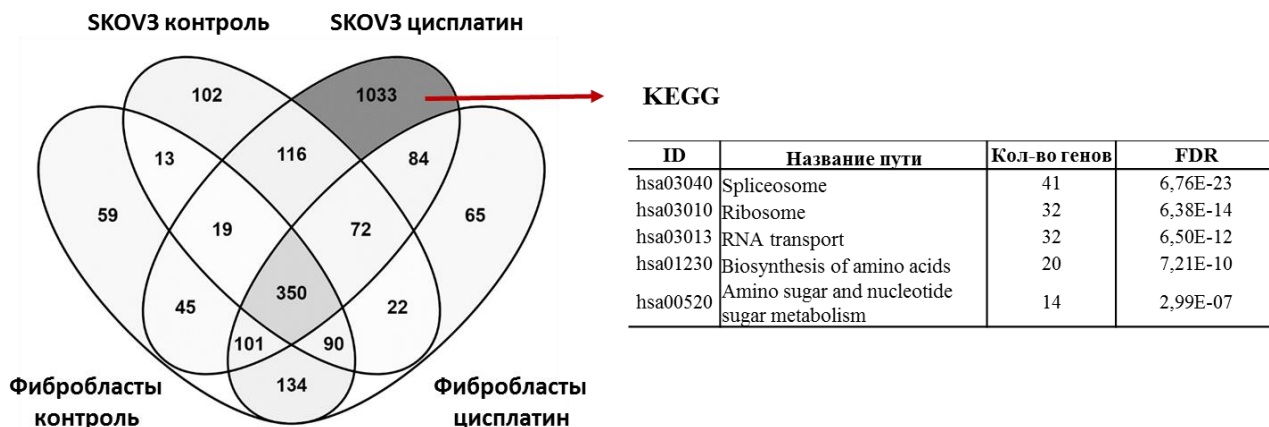
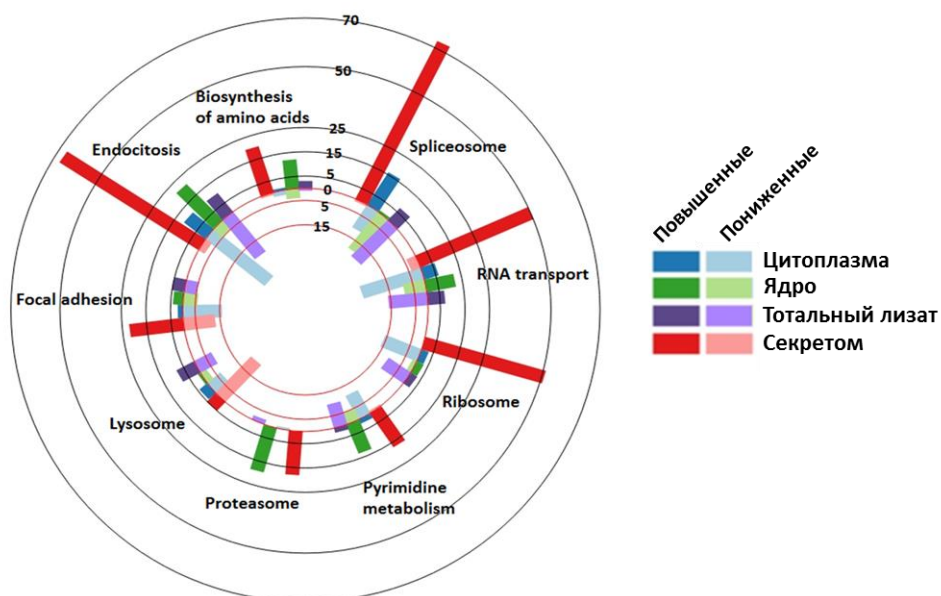


Рис. 16 – Сравнительный анализ секретомов клеток рака яичника SKOV3 и фибробластов до и после обработки цисплатином. Функциональная аннотация белков, секретируемых клетками SKOV3 в ответ на ХТ.

Суммируя все приведенные выше данные, видно, что во всех исследованных раковых секретомов в ответ на терапию значительно увеличивается представленность белков, имеющих отношение к сплайсосоме. Однако в норме эти белки располагаются в ядре, и для того, чтобы быть секретированными из клетки, им необходимо сначала переместиться из ядра в цитоплазму. По этой причине мы исследовали, как изменяется относительное распределение белков между цитоплазмой и ядром в ответ на действие цисплатина. Для этого мы проанализировали изменение белкового профиля в клетках SKOV3 через 24 ч. после добавления цисплатина. Для анализа были отобраны равные количества экстрактов ядерной и цитоплазматической фракций, а также тотального клеточного лизата. В целом, было идентифицировано 4085 белков. Дифференциально представленными считали белки, отличающиеся в 2 и более раз. Как и ожидалось, мы обнаружили, что при индукции апоптоза количество сплайсосомных белков снижается в ядре и увеличивается в цитоплазме (Рис.17).

Рис. 17 – круговая диаграмма, показывающая основные метаболические пути, в которые вовлечены дифференциально повышенные и пониженные белки, для фракций ядер, цитоплазмы, тотальных лизатов и секретомов этих же клеток SKOV3 после обработки цисплатином относительно контрольных необработанных клеток и их секретомов.



Интересно, что для белков, относящихся к протеасоме (Proteasome), эндоцитозу (Endocytosis), биосинтезу аминокислот (Biosynthesis of amino acids) и пиримидиновому метаболизму (Pyrimidine metabolism), наблюдалась обратная картина – их количество, наоборот, повышалось в ядре и снижалось в цитоплазме после индукции апоптоза (Рис.17).

Такой результат свидетельствует в пользу того, что при повреждении ДНК сплайсосомные белки могут специфически транспортироваться из ядра в цитоплазму. Это предположение косвенно подтверждается данными, опубликованными ранее, о том, что при индукции апоптоза происходит диссоциация некоторых сплайсосомных белков от хроматина (Tresini, 2015; Busa, 2010). Смена локализации может быть потенциальной причиной обнаружения этих ядерных белков во внеклеточной среде.

3. Выявление роли компонентов сплайсосомы в межклеточной коммуникации раковых новообразований

Чтобы определить, могут ли сплайсосомные белки и мРНК перемещаться во внеклеточное пространство и поглощаться реципиентными клетками, мы культивировали раковые клетки-доноры в среде, содержащей 5-этинил уридин (5-EU). 5-EU свободно проникает внутрь клеток и включается в состав вновь синтезированных молекул РНК. Через сутки после добавления 5-EU, клетки глиобластомы были облучены дозой ионизирующего излучения и через 48 ч. из среды были выделены везикулы, секретированные этими клетками. Выделенные везикулы были добавлены к реципиентным клеткам глиобластомы и через 24 ч. клетки были фиксированы, а экзогенные молекулы РНК, попавшие внутрь клеток из везикул, были окрашены азидом Alexa 488. Такой метод позволил окрасить экзогенные молекулы, меченные 5-EU, но не эндогенные, не меченные молекулы РНК. В дополнение к окрашиванию РНК мы также окрасили белок сплайсосомы SF3A3 методом иммуноцитохимии. По данным конфокальной микроскопии (Рис.18), хорошо видно, что белок SF3A3 колокализуется с меченой РНК в некоторых (но не всех) везикулах. Интересно, что меченая РНК из донорных клеток наблюдается в ядрах и в ядрышках реципиентных клеток. Это может говорить о том, что таким образом могут переноситься как мРНК, так и малые ядрышковые РНК.

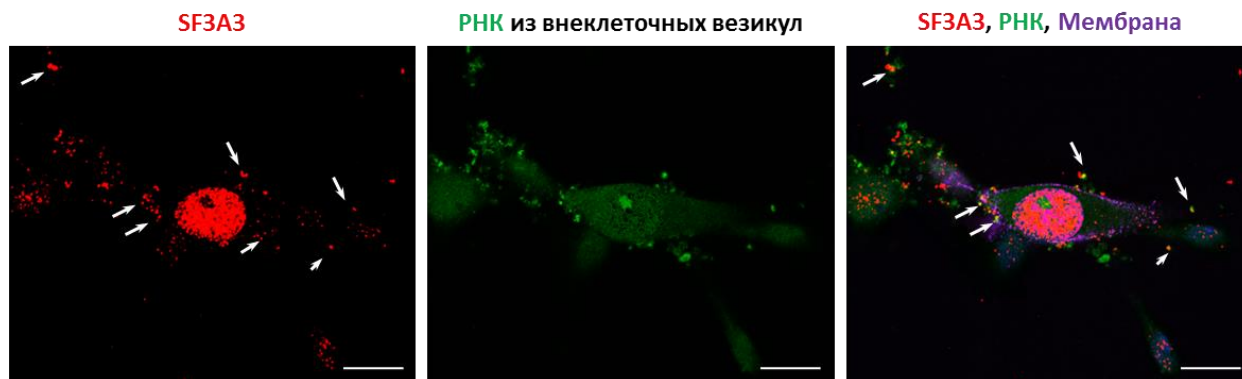


Рис. 18 – Внеклеточные везикулы из апоптотирующих клеток глиобластомы (через 3 дня после действия ионизирующего излучения) содержат сплайсосомный белок SF3A3 и различные типы меченой РНК, которые поглощены реципиентными клетками. Масштаб: 20 мкм.

Так, на основании наших экспериментальных данных, для изучения функциональной значимости в межклеточной коммуникации злокачественных опухолей было выбрано два вида мяРНК, относящихся к минорной сплайсосоме – U12 и U6atac.

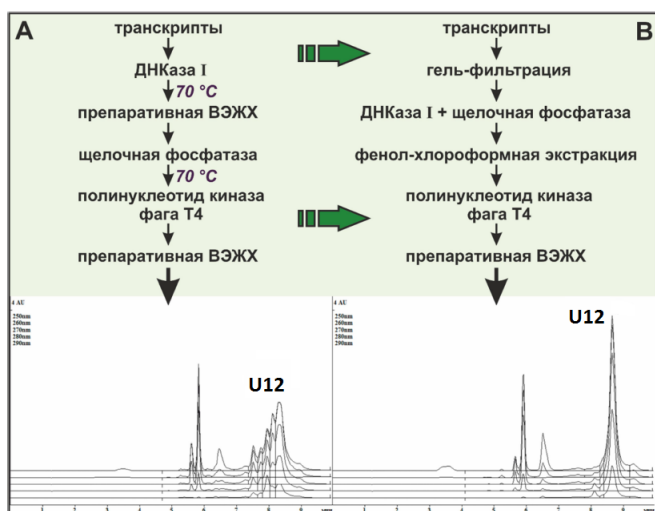


Рис. 19 – Сравнение двух альтернативных методик инактивации ферментов и очистки продуктов транскрипции от компонентов реакционных смесей. На верхней панели представлена последовательность стадий используемых методик. На нижней панели приведены результаты финальных препаративных хроматографий.

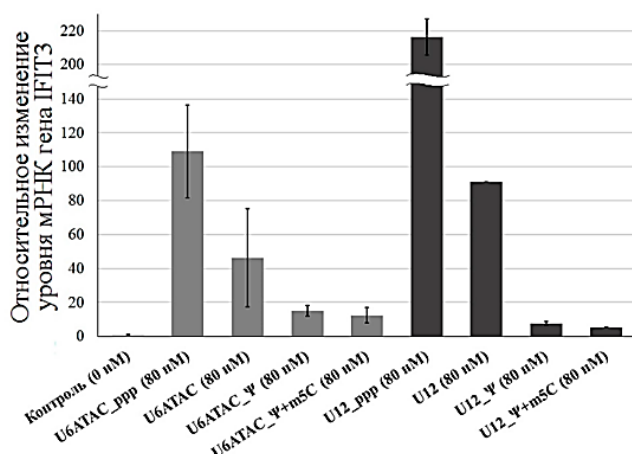


Рис. 20 – Диаграмма уровня мРНК гена IFIT3 в клетках MCF-7, трансфицированных синтетическими аналогами мяРНК, содержащими неканонические нуклеотиды: 5-метилцитидин (m5C) и псевдоуридин (Ψ), и структуры кэпа на 5'-конце (моно-(m³G) или триметилированного (m₃^{2,2,7}G) гуанозина для U6atac и U12 мяРНК, соответственно), по сравнению с немодифицированными аналогами, содержащими 5'-трифосфат (U6atac_ppp и U12_ppp). Представлено среднее значение изменения уровня мРНК IFIT3 относительно контрольных клеток с указанием стандартного отклонения, рассчитанного по данным трех независимых экспериментов.

Для этого, во-первых, была разработана эффективная схема синтеза РНК, минимизирующая деградацию продукта (Рис.19). Во-вторых, чтобы исключить активацию неспецифического иммунного ответа и цитотоксичность экзогенных одноцепочечных РНК, была выбрана успешная комбинация и глубина включения модифицированных мономеров в структуру мяРНК (Рис.20).

Результаты оценки цитотоксического действия полученных мяРНК на клетки MCF-7 позволили заключить, что замещение в составе синтетических РНК уридина на

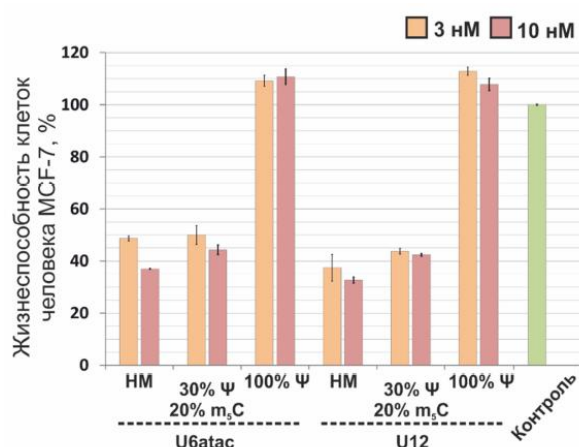


Рис. 21 – Диаграмма изменения жизнеспособности клеток аденокарциномы молочной железы MCF-7 под действием аналогов U6atac и U12 мяРНК. Представлено среднее значение МТТ-индекса относительно контроля ± стандартное отклонение, рассчитанное по данным трех измерений. Жизнеспособность контрольных клеток принимали за 100% (HM – немодифицированные аналоги с трифосфатом на 5'-конце; 30% Ψ/20% m₅C и 100% Ψ – синтезированы в присутствии 30% Ψ + 20% m₅C и 100% Ψ, соответственно, и несут структуру кэпа на 5'-конце).

псевдоуридин (Ψ), наряду с заменой 5'-трифосфата на кэп, не только обеспечивает снижение иммуностимулирующей активности таких РНК, но и устраняет быстрый цитотоксический эффект в концентрациях РНК до 10 нМ (Рис.21). Аналогичные данные были получены в экспериментах на клетках SKOV3. В результате, для снижения неспецифических эффектов в

качестве наиболее эффективной модификации была выбрана полная замена уридина на Ψ с включением моно- или три-метилированного кэпа (для Ubatas и U12 мяРНК, соответственно). После чего, был подобран способ эффективной трансфекции и произведена оценка эффективности накопления, стабильности и локализации синтетических мяРНК в клетках (Рис.22).

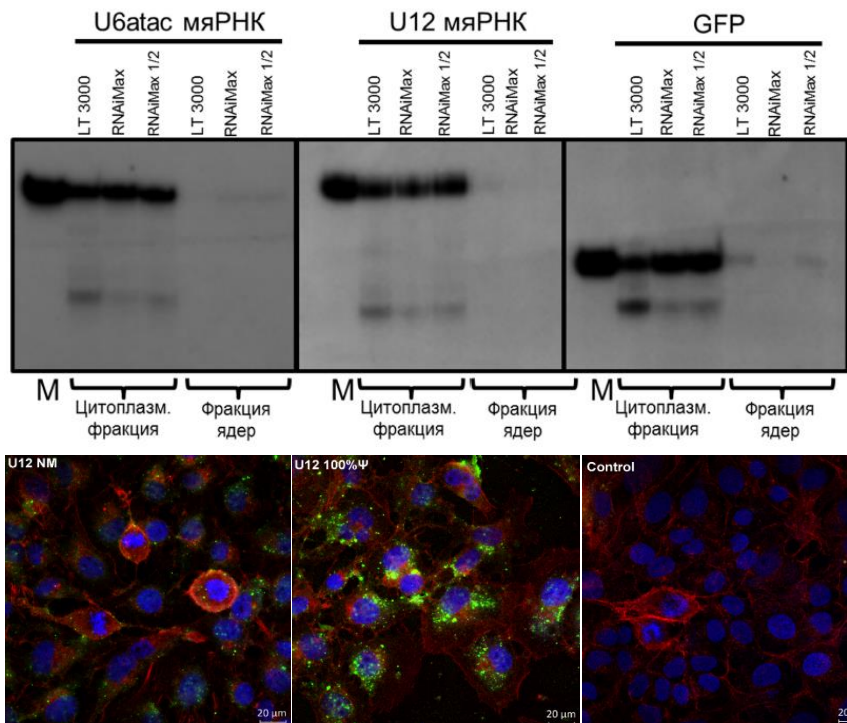


Рис. 22 – Верхняя панель: Оценка стабильности Ubatas и U12 мяРНК и контрольного фрагмента РНК GFP (89 нк) с радиоактивными метками в цитоплазматической и ядерной фракциях после трансфекции клеток MCF-7 разными трансфицирующими агентами (LT 3000 – липофектамин 3000; RNAiMax – липофектамин RNAiMax; М – маркер молекулярного веса).

Нижняя панель: Данные конфокальной микроскопии, отражающие локализацию аналогов U12 мяРНК через 24 ч. после трансфекции клеток SKOV3. Аналоги РНК были синтезированы с содержанием 25% AA-UTP + FITC. Масштаб: 20 мкм. (НМ – немодифицированные аналоги с трифосфатом на 5'-конце).

Для установления глобальных путей функционирования экзогенных мяРНК внутри реципиентных раковых клеток мы использовали (I) метод секвенирования транскриптома на платформе Illumina (NextSeq System) и (II) LC-MS/MS анализ.

Нами было произведено параллельное секвенирование полиаденилированной фракции суммарной РНК из клеток аденокарциномы яичника SKOV3 через 48 ч. после трансфекции аналогами U12 и Ubatas мяРНК в трех биологических повторах, в качестве контроля использовались клетки, трансфицированные фрагментом мРНК гена GFP (89 нк), а также клетки SKOV3, трансфицированные липофектаминол RNAiMax без добавления какой-либо РНК. Данные дифференциальной экспрессии в образцах относительно контрольных необработанных клеток приведены в Таблице 1.

Таблица 1 – Дифференциальная экспрессия генов во всех образцах против контрольных образцов с липофектоминол.

Группы сравнения	Экспрессия повышена	Экспрессия понижена
U12 против контроль_RNAiMax	524	266
Ubatas против контроль_RNAiMax	304	28
GFP против контроль_RNAiMax	51	26

Наиболее сильные изменения в экспрессии генов как в сторону повышения (524 гена), так и в сторону понижения (266 генов) вызывала U12 мяРНК. Ubatas мяРНК также вызывала значимые изменения в экспрессии генов, в то время, как контрольная РНК GFP приводила к

наименьшему количеству изменений, что позволяет заключить, что выбранный нами контроль является адекватным для оценки относительной экспрессии генов. Метод многомерного шкалирования (MDS), используемый для визуализации и изучения кластеризации данных, показал четкое разделение между контрольными и трансфицированными клетками (Рис.23А-Б).

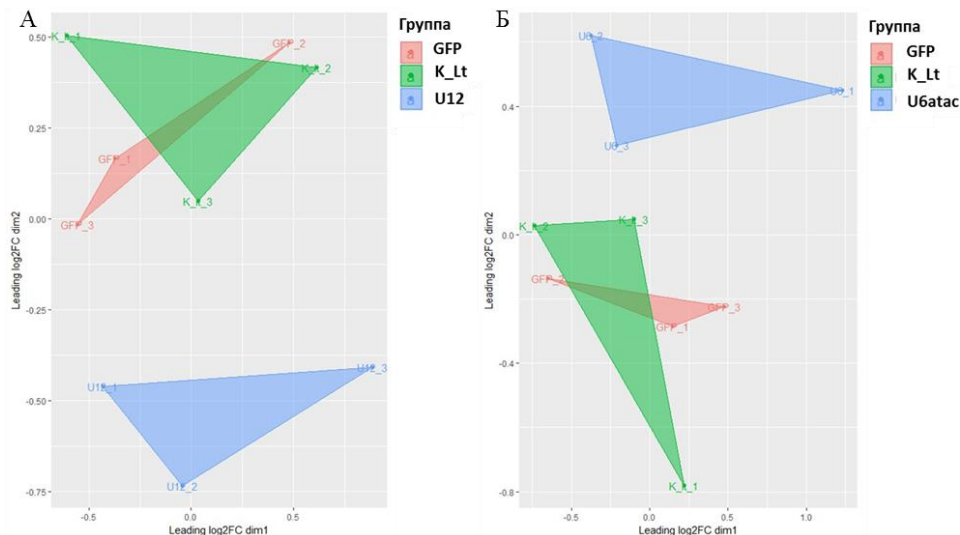


Рис. 23 – Метод многомерного шкалирования (MDS) всех экспрессирующихся генов отражает значительные изменения между контрольными клетками (зеленый и красный цвета) и клетками, трансфицированными (А) U12 мяРНК, (Б) Ubatas мяРНК (синий цвет).

Для функциональной аннотации дифференциально экспрессирующихся генов были использованы базы данных Gene Ontology, KEGG, Reactome. Первым существенным результатом функционального анализа является отсутствие активации интерферон-чувствительных сигнальных путей. Функциональная аннотация генов с повышенной экспрессией в клетках SKOV3 после трансфекции U12 и Ubatas мяРНК выявила, что оба типа мяРНК приводят к активации генов, вовлеченных в регуляцию клеточного цикла, а особенно генов, важных для М-фазы (Рис.24).

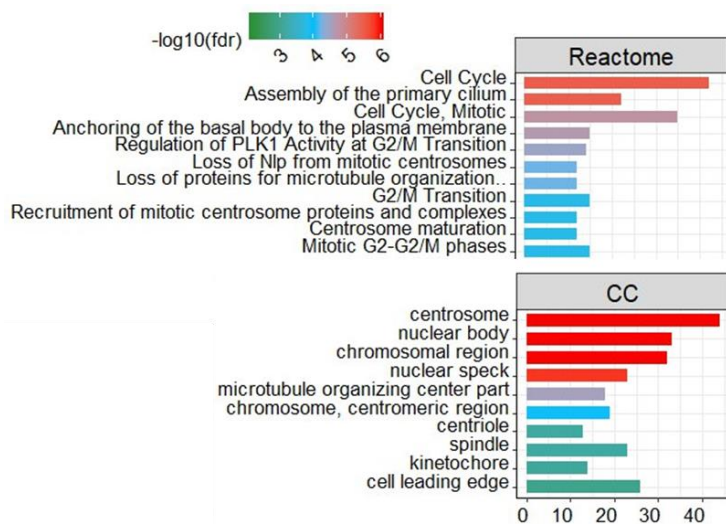


Рис. 24 – Статистически значимые ($p < 0,05$) кластеры генов, дифференциально повышенные в клетках SKOV3, трансфицированных U12 мяРНК, относительно контрольных клеток. Данные обогащения получены с использованием баз данных Gene Ontology Cell Component (CC) и Reactome.

U12 и Ubatas мяРНК приводили к повышению экспрессии 100 и 35 генов, относящихся к М фазе клеточного цикла, соответственно. Большая часть этих генов кодируют белки centrosомы, которые, в свою очередь, контролируют прогрессию клеточного цикла и сборку кинетохор и веретена деления. Таким образом, экзогенные сплайсосомные мяРНК могут влиять на регуляцию клеточного цикла, что согласуется с данными, опубликованными ранее

(Maslon, 2014). Однако, нам впервые удалось показать, что на активацию генов митотической фазы клеточного цикла, влияют не только сплайсосомные белки, но также и сплайсосомные мяРНК (U12 и Ubatac).

Кроме того, мяРНК провоцировали повышение экспрессии генов, способствующих клеточной миграции: MATN2, ITGB1, FGFR1OP. На основании этого, с помощью ОТ-ПЦР, мы провели оценку изменений в уровне экспрессии генов, связанных с регуляцией ЭМП раковых клеток. Было выяснено, что после трансфекции аналогов малых ядерных РНК, в клетках SKOV3 наблюдается тенденция к смещению к мезенхимальному фенотипу, что может способствовать лучшему выживанию раковых клеток в условиях химиотерапевтического стресса.

Чтобы подтвердить данные, полученные на уровне экспрессии, было произведено протеомное профилирование белков, выделенных из клеток рака яичника SKOV3 через 48 ч. после трансфекции различными типами мяРНК (U12 и Ubatac). В качестве контроля были взяты клетки, обработанные липофектами без каких-либо РНК, и клетки, трансфицированные фрагментом мРНК гена GFP. Всего было идентифицировано 4813 белков (Рис.25). Для того, чтобы найти изменения в представленности белков в клетках до и после трансфекции различными нкРНК, мы использовали программу MaxQuant, за значимые мы считали отличия в 2 раза.

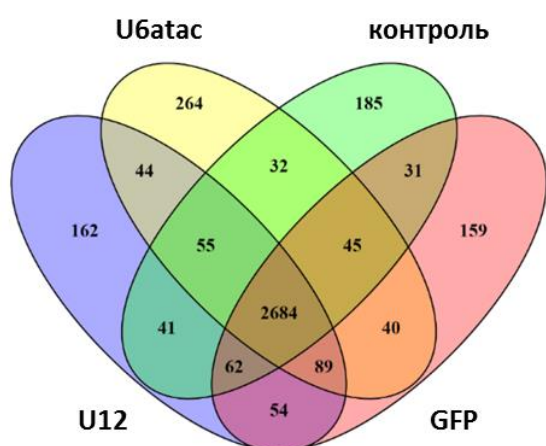


Рис. 25 – Распределение белков, идентифицированных в клетках, трансфицированных U12 и Ubatac мяРНК.

Интересно, что среди дифференциально повышенных белков в клетках, трансфицированных как U12, так и Ubatac мяРНК, одни из самых значимых отличий наблюдались для кластеров регуляции клеточного цикла, а также М-фазы, что хорошо коррелирует с данными транскриптомного анализа (Рис.25). Кроме того, эти данные были подтверждены анализом клеточного цикла. Таким образом, на основании протеомных и транскриптомных данных можно заключить, что трансфекция клеток SKOV3 обоими типами мяРНК повышает представленность генов и

белков – участников различных этапов митоза. Так, усиливается представленность генов/белков, способствующих переходу клеток SKOV3 в М-фазу клеточного цикла, повышается представленность генов/белков, относящихся к событиям профазы митоза, а также появляются ключевые регуляторы, позволяющие клетке переходить из метафазы в анафазу.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нет сомнений, что межклеточная коммуникация вносит важный вклад в прогрессию злокачественных новообразований, а также в возникновение химиорезистентности. Однако

механизмы, лежащие в основе этих событий, недостаточно изучены на молекулярном уровне. До настоящего времени все усилия, направленные на исследование возникновения резистентности к той или иной терапии, сводились к рассмотрению того, что происходит в самих опухолевых клетках через разные промежутки времени после стрессового воздействия. Секретомы опухолевых клеток были ранее проанализированы только при нормальных условиях, и эти работы были направлены исключительно на поиск онкомаркеров с целью диагностики онкологического заболевания.

С использованием омиксных технологий и методов классической молекулярной биологии в данной работе были комплексно изучены асциты пациенток с аденокарциномой яичника до и после химиотерапии, а анализ асцитов неопухолевой этиологии позволил выявить опухоль-специфичные компоненты. Было обнаружено большое разнообразие типов молекул. Среди них были идентифицированы низкомолекулярные метаболиты, такие как лизофосфатидная кислота, холестерин, различные жирные кислоты и их амиды. Также обнаружено повышенное количество экзосом – важных переносчиков биомолекул из клетки в клетку. Наиболее интересным оказалось, что химиотерапия индуцирует секрецию мяРНК и белковых компонентов сплайсосомы.

Результаты данного исследования дали возможность по-новому взглянуть на секретом опухолевых клеток, так как весьма любопытным оказался тот факт, что представленность большинства известных межклеточных сигнальных медиаторов, таких как цитокины, хемокины и факторы роста, значительно падала в образцах асцитов после химиотерапии. Однако при этом молекулы, секретлируемые клетками под действием терапии, могут придавать соседним раковым клеткам более устойчивый и агрессивный мезенхимальный фенотип. Информация, полученная нами из реального клинического материала, была подтверждена на нескольких клеточных культурах *in vitro*. Было доказано, что как секретомы, так и асциты после химиотерапии обогащены сплайсосомными белками и мяРНК. В связи с этим, мы впервые предположили, что эффект секретомов может частично обуславливаться наличием в них мяРНК сплайсосомы. Чтобы подтвердить эту гипотезу, был разработан новый подход к *in vitro* синтезу этих РНК, и проведено полнотранскриптомное секвенирование клеток-реципиентов после добавления к ним *in vitro* синтезированных аналогов мяРНК сплайсосомы. Эти результаты впервые продемонстрировали важную роль экзогенных сплайсосомных мяРНК в изменении фенотипа раковых клеток.

Таким образом, данное исследование раскрывает ранее неизвестные сигнальные молекулы в микроокружении рака яичника, которые имеют потенциальную клиническую значимость.

ВЫВОДЫ

1) Разработана эффективная схема фракционирования асцитов перед LC-MS/MS анализом. Выявлен ряд РНК-связывающих белков, а также некодирующих РНК и липидных компонентов, специфичных для опухолевых асцитов.

2) Впервые исследовано, как изменяются секреты раковых клеток *in vivo* (асцитные жидкости) и *in vitro* на фоне химиотерапии. Продемонстрировано, что клетки аденокарциномы яичника *in vivo* и *in vitro* в ответ на химиотерапию специфически секретируют компоненты сплайсосомы: сплайсосомные белки и все типы малых ядерных РНК сплайсосомы.

3) Впервые показано, что опухолевые секреты *in vivo* и *in vitro* после химиотерапии способствуют формированию химиорезистентности реципиентных раковых клеток.

4) Проведено комплексное исследование действия экзогенных мРНК сплайсосомы на раковые клетки. Установлено, что синтетические аналоги U12 и Ubatas малых ядерных РНК, попадая в опухолевые клетки из внеклеточного пространства, частично воспроизводят эффект секретомов, связанный с формированием агрессивного фенотипа раковых клеток.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи

1. **Shender V.**, Pavlyukov M., Ziganshin R., Arapidi G., Kovalchuk S., Anikanov N., Altukhov I., Alexeev D., Butenko I, Shavarda A., Khomyakova E., Evtushenko E., Ashrafyan L., Antonova I., Kuznetsov I., Gorbachev A., Shakhparonov M., Govorun V. Proteome-Metabolome Profiling of Ovarian Cancer Ascites Reveals Novel Components Involved in Intercellular Communication// Molecular and Cellular Proteomics.-2014.-Vol.13(12)-P.3558-71.

2. Кормош Н., Зиганшин Р., **Шендер В.**, Воюшин К., Доненко Ф. Изменение белкового состава сыворотки крови мышей с трансплантированной карциномой Эрлиха// Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.-2014.-Т.158; №10-С.491-494.

3. Ziganshin R., Ivanova O., Lomakin Ya., Belogurov A. Jr, Kovalchuk S., Azarkin I., Arapidi G., Anikanov N., **Shender V.**, Piradov M., Suponeva N., Vorobyeva A., Gabibov A., Ivanov V., Govorun V. The Pathogenesis of the Demyelinating Form of Guillain-Barre Syndrome (GBS): Proteo-peptidomic and Immunological Profiling of Physiological Fluids// Molecular and Cellular Proteomics.-2016.-Vol.15(7)-P.2366-78.

4. Логвина Н.А., **Шендер В.О.**, Арапиди Г.П., Холина Т.Д. Роль везикулярной передачи межклеточных сигналов в развитии злокачественных новообразований// Биоорганическая химия.-2018.-2(44)-С.113-125.

5. Алешикова О.И., Антонова И.Б., Бабаева Е.В., Герфанова Е.В., **Шендер В.О.**, Ашрафян Л.А. Оценка уровней цитокинов в асцитической жидкости при раке яичников на фоне неоадьювантной химиотерапии// Доктор.Ру.-2018.-№2(146)-С.63-68.

Тезисы докладов на конференциях

1. **Shender V.**, Ziganshin R., Arapidi G., Kovalchuk S., Anikanov N., Govorun V. «Ascites and sera proteome and peptidome analysis for potential biomarker discovery of ovarian cancer». In Proceedings of the 38th FEBS Congress, Saint Petersburg – 2013; p. 130.

2. **Shender V.**, Pavlukov M., Arapidi G., Kovalchuk S., Anikanov N., Altukhov I., Alexeev D., Ziganshin R., Govorun V. «Proteome and metabolome analysis of ovarian cancer ascites as cell-cell communication medium». In Proceedings of the 39th FEBS EMBO Conference, Paris, France // The Febs Journal – 2014;V.281:497-498.

3. **Shender V.**, Pavlukov M., Arapidi G., Kovalchuk S., Anikanov N., Ziganshin R., Govorun V. «Deciphering Specific Features of the Ovarian Cancer Ascites Proteome». In Proceedings of the International Conference on Bioorganic Chemistry, Biotechnology and Bionanotechnology, IBCH, Moscow // Special Issue ActaNaturae – **2014**;V.1:58-59. Устный доклад.
4. **Shender V.**, Pavlukov M., Arapidi G., Kovalchuk S., Anikanov N., Ziganshin R., Govorun V. «Proteome analysis of ovarian cancer ascites as a medium for intercellular communication». In Proceedings of the 13th Human Proteome Organization World Congress (HUPO), Madrid, Spain – **2014**.
5. **Shender V.**, Pavlukov M., Arapidi G., Kovalchuk S., Anikanov N., Ziganshin R., Govorun V. «Comprehensive proteome analysis of ovarian cancer ascites as a medium for intercellular communication». In Proceedings of the 4th International Conference on Science and Applied Research Post-Genome Methods of Analysis in Biology and Laboratory and Clinical Medicine, Kazan – **2014**; p. 66. Устный доклад.
6. **Шендер В.О.**, Павлюков М.С., Арапиди Г.П., Ковальчук С.И., Аниканов Н.А., Зиганшин Р.Х., Муравьева А.В., Доненко Ф.В. и Говорун В.М. «Использование протеомных подходов к изучению межклеточной коммуникации на примере асцитов при раке яичников». VII Российский Симпозиум «Белки и Пептиды», Новосибирск – **2015**; p.134. Устный доклад.
7. **Shender V.**, Pavlukov M., Arapidi G., Kovalchuk S., Anikanov N., Donenko F., Muravieva A., Ziganshin R., Govorun V. «Studying of malignant ascites as a unique tumor microenvironment». In Proceedings of the 14th Human Proteome Organization World Congress (HUPO), Vancouver, Canada – **2015**; p. 165.
8. Pavlyukov M., Mohyeldin A., **Shender V.** et. al. «Intercellular Transfer of Splicing Factors via Extracellular Vesicles Promotes Glioblastoma Growth and Therapy Resistance». In Proceedings of the Experimental Biology Meeting, San-Diego, U.S.A. // The FASEB Journal – **2016**;V.30;№1 Supplement: 590.2.
9. **Shender V.**, Stepanov G., Juravlev E., Pavlyukov M., Arapidi G., Richter V., Govorun V. «Spliceosomal snRNAs contribute to communication between ovarian cancer cells». In Proceedings of the EMBL Symposium «Complex Life of mRNA». Heidelberg, Germany – **2016**; p.283
10. **Shender V.**, Shnaider P., Anufrieva K., Arapidi G., Butenko I., Malianc I., Stepanov G., Juravlev E., Pavlyukov M., Govorun V. «DNA damage-induced crosstalk between cancer cells and their microenvironment». In Proceedings of the Proteomic Forum, Potsdam, Germany – **2017**; p. 41.
11. **Shender V.**, Anufrieva K., Arapidi G., Shnaider P., Stepanov G., Juravlev E., Malianc I., Pavlyukov M., Butenko I., Govorun V. «Role of Therapy-Induced Cellular Secretomes in Resistance of Cancer Cells». In Proceedings of the 42th FEBS Congress, Jerusalem, Israel // The FEBS Journal – **2017**;284 (Suppl. 1);274.
12. **Шендер В.О.**, Шнайдер П.В., Ануфриева К.С., Арапиди Г.П., Павлюков М.С., Степанов Г.А., Журавлев Е.С., Лебедева О.С., Рихтер В.А., Лагарькова М.А., Говорун В.М. «Исследование вклада межклеточной коммуникации в возникновение резистентности злокачественных опухолей к химиопрепаратам». VIII Российский Симпозиум «Белки и Пептиды», Москва // ActaNaturae – 2017; 9 (спецвыпуск №1);40. Устный доклад.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

CPLL – комбинаторные гексапептидные лигандные библиотеки (*combinatorial hexapeptide ligand libraries*); **LC-MS/MS** – тандемная масс-спектрометрия, совмещенная с высокоэффективной жидкостной хроматографией; **MDS** – метод многомерного шкалирования (*multidimensional scaling*); **NTA** – метод анализа треков наночастиц (*nanoparticle tracking analysis*); **PCA** – Метод главных компонент (*principal component analysis*); **SDS-PAGE** – электрофорез в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях; **мяРНК** – малая ядерная РНК; **ХТ** – Химиотерапия; **ЭМП** – эпителиально-мезенхимальный переход; **Ψ** – псевдоуридин; **5-EU** – 5-этинил-уридин.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает искреннюю благодарность своему научному руководителю академику РАН, профессору, д.б.н. В.М. Говоруну за наставничество в работе, конструктивную критику и личностный рост. Особую благодарность автор выражает д.х.н. Р.Х. Зиганшину за его поддержку, помощь и содействие в работе. Автор благодарит весь коллектив лаборатории протеомики ИБХ РАН за создание и поддержание дружественной атмосферы, а также за возможность обсуждения научных результатов. Автор выражает свою признательность коллективу лаборатории протеомного анализа и лаборатории клеточной биологии ФНКЦ ФХМ ФМБА за помощь и предоставленный доступ к оборудованию. Особую благодарность автор выражает чл.-корр. РАН, профессору, д.б.н. М.А. Лагарьковой за помощь в работе над диссертацией. Автор также благодарит к.б.н. М.С. Павлюкова (группа биоэнергетических мембранных систем ИБХ РАН) за его поддержку и продуктивный совместный труд. Искренняя благодарность выражается к.х.н. Г.А. Степанову (лаборатория медицинской биотехнологии Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск) за участие в работе и конструктивные замечания. Автор благодарит академика РАН, профессора, д.м.н. Л.А. Ашрафяна (Российский научный центр рентгенорадиологии) за предоставленный клинический материал, а также сотрудников Центра коллективного пользования Казанского федерального университета и ресурсного Центра коллективного пользования Санкт-Петербургского государственного университета за помощь в выполнении работы. Выражаю сердечную благодарность О.В. Шендер и к.б.н. Г.П. Арапиди за их невероятную поддержку в процессе моей научной работы.