

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ 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»

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Научный руководитель:
Доктор биологических наук, академик РАН, профессор
Говорун Вадим Маркович

Москва – 2018

СОДЕРЖАНИЕ

ТЕРМИНЫ И СОКРАЩЕНИЯ	6
ВВЕДЕНИЕ	9
Актуальность темы исследования	9
Цели и задачи исследования.....	10
Научная новизна работы и практическая значимость работы	11
ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	13
1 Механизмы возникновения резистентности	13
2 Явление компенсаторной пролиферации	14
3 Способы межклеточной коммуникации.....	16
3.1 Коммуникация, опосредованная белками	16
3.1.1 Механизмы секреции белков	18
3.1.1.1 Секреторная система типа I: образование пор в цитоплазматической мембране.....	20
3.1.1.1.1 Образование липидных пор при нормальных условиях	20
3.1.1.1.2 Образование пор под действием воспаления	21
3.1.1.2 Секреторная система типа III: секреция с использованием внутриклеточных структур.....	23
3.1.1.3 Секреторная система типа IV.....	24
3.2 Коммуникация, опосредованная метаболитами	24
3.2.1 Коммуникация раковых клеток посредством свободных жирных кислот.....	27
3.2.2 Коммуникация раковых клеток посредством простагландинов	28
3.2.3 Производные сфинголипидов как медиаторы коммуникации между раковыми и стромальными клетками	29
3.3 Циркулирующие РНК.....	29
3.4 Внеклеточные везикулы	32
4 Использование омиксных технологий в изучении межклеточной коммуникации	34
4.1 Протеомные технологии в изучении онкологических заболеваний	34
4.2 Метаболомные технологии в изучении онкологических заболеваний.....	37
Заключение.....	40
ГЛАВА II. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	41
1 Оборудование и материалы	41
2 Пациенты и биологические образцы	45
3 Получение асцитных жидкостей.....	47
4 Измерение концентрации белка.....	47

5 Пробоподготовка для метаболомного анализа.....	48
6 Масс-спектрометрия, совмещенная с газовой хроматографией.....	48
7 Обработка комбинаторными гексапептидными лигандными библиотеками	49
8 Электрофорез в полиакриламидном геле.....	49
9 Трипсинолиз в геле.....	49
10 LC-MS/MS анализ.....	50
11 Анализ LC-MS/MS данных.....	51
12 Иммуноблоттинг.....	52
13 Цитокиновое профилирование асцитов	52
14 Выделение экзосом из асцитов	53
15 Выделение РНК из асцитов	53
16 МТТ-тест	54
17 Работа с клеточными культурами	54
17.1 Для протеомных экспериментов.....	54
17.2 Для экспериментов с мяРНК.....	55
18 Протеомный анализ секретомов клеток	55
19 Трипсинолиз в растворе.....	56
20 Проточная цитофлуориметрия	56
21 Фракционирование клеток.....	57
22 Мечение молекул РНК в клетках-донорах и их детекция в клетках-реципиентах.....	57
23 Конструирование и синтез аналогов мяРНК	58
24 Получение FITC-меченных мяРНК	59
25 Введение [³² P]-метки по 5'-концу мяРНК.....	60
26 Трансфекция клеток MCF-7 и SKOV3 аналогами мяРНК	60
27 Выделение суммарной РНК клеток человека	60
28 Анализ накопления флуоресцентно-меченой РНК в клетках человека	61
29 Анализ стабильности радиоактивно меченых аналогов мяРНК в клетках человека	61
30 Анализ изменения уровня экспрессии генов в клетках человека, трансфицированных аналогами мяРНК	62
31 Определение жизнеспособности клеток с помощью МТТ-теста	62
32 Подготовка препаратов суммарной РНК клеток человека для дифференциального анализа экспрессии генов	62
33 Биоинформатический анализ дифференциальной экспрессии генов.....	63
ГЛАВА III. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	64
1 Изучение асцитов как среды для межклеточной коммуникации	64

1.1	Метаболомный анализ опухолевых асцитов и асцитов от пациенток с циррозом.....	65
1.2	Протеомный анализ опухолевых асцитов и асцитов от пациенток с циррозом	69
1.2.1	Разработка подхода к фракционированию асцитов.....	69
1.2.2	NTA анализ показал, что опухолевые асциты обогащены повышенным количеством экзосом.....	72
1.2.3	Полуколичественный анализ и выявление значимых отличий в опухолевых асцитах по сравнению с контрольными	73
1.3	Полуколичественный анализ и выявление значимых отличий в опухолевых асцитах до и после химиотерапии.....	75
1.4	Детекция сплайсосомных мяРНК в асцитах.....	77
1.5	Опухолевые асциты вносят вклад в формирование резистентности <i>de novo</i>	81
2	Секреты раковых клеток <i>in vitro</i>	84
2.1	Протективный эффект секретомов, индуцированных химиотерапией, на реципиентные раковые клетки	85
2.2	Протеомный анализ секретомов клеток после действия ХТ и ионизирующего излучения.....	87
2.3	Секреты раковых клеток, индуцированные химио- и радиотерапией, обогащены компонентами сплайсосомы.....	89
2.4	Влияние химиотерапии на секрецию неонкотрансформированных клеток	92
2.5	Изменения субклеточного протеома, индуцированные повреждением ДНК.....	98
3	Выявление роли компонентов сплайсосомы в межклеточной коммуникации раковых новообразований.....	100
3.1	Сплайсосомные белки и некоторые типы РНК, оказываясь во внеклеточной среде, могут поглощаться реципиентными клетками	100
3.2	Выявление роли внеклеточных сплайсосомальных мяРНК в межклеточной коммуникации злокачественных новообразований	101
3.2.1	Разработка схемы синтеза <i>in vitro</i> РНК-конструкций, несущих последовательности нескольких мяРНК	102
3.2.2	Предотвращение активации неспецифического иммунного ответа в трансфицированных клетках	104
3.2.3	Выбор оптимальных условий трансфекции	106
3.2.4	Выявление механизмов участия циркулирующих во внеклеточном пространстве мяРНК в межклеточной коммуникации	109
3.2.4.1	Анализ дифференциальной экспрессии генов в раковых клетках, трансфицированных синтетическими аналогами мяРНК	109

3.2.4.2 Анализ протеома в раковых клетках, трансфицированных синтетическими аналогами мРНК	114
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	117
ВЫВОДЫ	119
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	120
ПРИЛОЖЕНИЕ 1	136
ПРИЛОЖЕНИЕ 2	137
ПРИЛОЖЕНИЕ 3	138
ПРИЛОЖЕНИЕ 4	139
ПРИЛОЖЕНИЕ 5	140
ПРИЛОЖЕНИЕ 6	141
ПРИЛОЖЕНИЕ 7	142

ТЕРМИНЫ И СОКРАЩЕНИЯ

Межклеточная коммуникация – это передача информации от одной клетки другим. Клетки передают сигналы за счет прямых контактов с другими клетками или с помощью высвобождения различных компонентов (гормоны, белки, микроРНК, липиды и т.д.), которые могут поглощаться другими клетками. Это даёт возможность одной клетке контролировать поведение остальных. Межклеточная коммуникация важна для роста и нормальной работы клеток. Нарушения в системе передачи сигналов могут привести к развитию рака, аутоиммунных заболеваний и диабета. Понимание механизмов межклеточной коммуникации может привести к разработке методов лечения этих заболеваний.

Секретом – это термин, который описывает совокупность белков и других компонентов, которые секретируются клеткой, тканью или организмом в данный момент времени при конкретных условиях. Секретом представляет собой важные белки, а также компоненты небелковой природы (гормоны, микроРНК, липиды и т.д.), которые контролируют и регулируют различные биологические и физиологические процессы. Это делает секретом клинически важным источником биомаркеров, а также мишеней для терапевтического воздействия.

AA-UTP – 5-аминоалилуридин-5'-трифосфат

АТФ – аденозинтрифосфат (*Adenosine triphosphate*)

CPLL – комбинаторные гексапептидные лигандные библиотеки (*Combinatorial hexapeptide ligand libraries*)

СТР – цитидинтрифосфат

FDR – уровень ложноположительных результатов (*False discovery rate*)

FITC – флуоресцеин изотиоцианат (*Fluorescein isothiocyanate*)

GC-MS – масс-спектрометрия, совмещённая с газовой хроматографией

Gd-Cl – гуанидингидрохлорид

GFP – зеленый флуоресцентный белок (*Green fluorescent protein*)

GO – Генная онтология (*Gene Ontology*)

HEPES – 4-(2-оксиэтил)1-пиперазинэтансульфоновая кислота

IC50 – концентрация полумаксимального ингибирования

KEGG – Киотская энциклопедия генов и геномов (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*)

LC-MS/MS – тандемная масс-спектрометрия, совмещенная с высоко-эффективной жидкостной хроматографией

LPA – лизофосфатидиловая кислота

m^{2,2,7}GP3G – триметилированный аналог кэпа (*Trimethylated Cap Analog*)

m³GP3G – монометилированный аналог кэпа (*Monomethylated Cap Analog*)

m5C – 5-метил-цитидин

m5CTP – 5-метилцитидинтрифосфат (*5-Methylcytidine-5'-triphosphate*)

m6A – N6-метиладенозин

m6ATP – N6-метиладенозинтрифосфат (*N6-Methyladenosine-5'-triphosphate*)

MALDI – матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization*)

MDS – метод многомерного шкалирования (*Multidimensional scaling*)

NTA – метод анализа треков наночастиц (*Nanoparticle tracking analysis*)

PAGE – электрофорез в полиакриламидном геле

PBS – натрий-фосфатный буфер (*Phosphate buffered saline*)

PCA – метод главных компонент (*Principal component analysis*)

PLS – метод наименьших квадратов (*Partial least squares regression*)

SDS – додецилсульфат натрия

SELDI – усиленная поверхностью лазерная десорбция/ионизация (*Surface-enhanced laser desorption/ionization*)

TMS – триметилсилил (*Trimethylsilyl*)

UTP – уридинтрифосфат

Ψ – псевдоуридин

ΨTP – псевдоуридинтрифосфат

ДМСО – диметилсульфоксид

ДТТ – дитиотреитол

е.а. – единица активности

МТТ – 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2

мяоРНК – малая ядрышковая РНК

мяРНК – малая ядерная РНК

нкРНК – некодирующая РНК

ОТ-ПЦР – обратная транскрипция с последующей полимеразной цепной реакцией

офВЭЖХ – обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография

ПААГ – полиакриламидный гель

пре-мРНК – предшественник матричной РНК

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПНК Т4 – полинуклеотид киназа фага Т4

рРНК – рибосомальная РНК

тРНК – транспортная РНК

ТСХ – тонкослойная хроматография

ХТ – химиотерапия

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

На сегодняшний день разработано множество разнообразных противоопухолевых препаратов. Все эти соединения изначально показывали высокую эффективность как во время предварительных исследований на модельных животных, так и на более поздних стадиях клинических испытаний, проводимых на людях. Однако, 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. Таким образом, даже если препарат был эффективен на ранних этапах лечения, вскоре его применение становится бессмысленным из-за многократного снижения чувствительности опухолевых клеток к его действию. 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 [1]. 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 [2-4]. Это явление «индуцированной апоптозом пролиферации» хорошо описано в медицинской практике, однако, недостаточно изучено на молекулярном уровне.

Имеются данные, что погибающие в ходе терапии раковые клетки могут секретировать во внеклеточную среду сигнальные молекулы, которые способствуют выживанию соседних опухолевых клеток [3-7]. Недавно нами и другими исследователями было показано, что раковые клетки способны обмениваться «информацией» с помощью макромолекулярных комплексов, а также белков и РНК, заключённых в везикулы различного типа [3, 4, 8]. Было показано, что молекулы, секретируемые погибающими раковыми клетками, способны повышать метаболическую активность, клеточную миграцию, а также устойчивость к апоптозу выживших опухолевых клеток [2-4]. Таким образом, для понимания причин возникновения резистентности опухолевых клеток к терапии, крайне важно учитывать роль межклеточной передачи сигналов, возникающих в ходе лечения.

Многие работы, посвященные изучению возникновения резистентности к терапии, сводятся к изучению процессов, происходящих в самих опухолевых клетках через разные промежутки времени после стрессового воздействия [3, 9-11]. Однако, на наш взгляд, не совсем корректно рассматривать клетку как отдельно существующую единицу, необходимо также учитывать её взаимодействие с микроокружением, таким как соседние опухолевые и нормальные клетки, а также внеклеточный матрикс.

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 [8, 12, 13]. 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. Принимая во внимание тот факт, что чувствительные к химиопрепаратам опухолевые клетки составляют основную популяцию, на которую воздействует лекарственный препарат, можно предположить, что сигнальные молекулы, секретируемые этими клетками во внеклеточную среду, могут оказывать существенное влияние на фенотип небольшого числа устойчивых к терапии клеток. 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 исследования

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 работы и практическая значимость 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 опухолевых 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.

ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1 Механизмы возникновения резистентности

Химио- и радиотерапия в комплексе с хирургическим удалением злокачественного новообразования остаются одними из основных компонентов лечения раковых опухолей, однако частым последствием такого лечения является возникновение резистентности как к отдельным препаратам, так и к их комбинациям [14, 15]. Существует два варианта возникновения резистентности у опухолевых клеток: собственная (внутренняя) и приобретенная. Внутренняя резистентность предполагает, что еще до получения дозы химиопрепарата, факторы, опосредующие резистентность, уже существуют в раковых клетках, что делает терапию неэффективной. Так, хорошо известно, что клетки опухоли могут характеризоваться высокой степенью молекулярной неоднородности клеток, и поэтому резистентность к лекарственным средствам может возникнуть в результате терапевтического отбора резистентной незначительной субпопуляции клеток, которая присутствует в исходной опухоли. Приобретенная резистентность развивается в процессе подавления опухолей, которые первоначально были чувствительными к данному химиопрепарату. Её механизм основан на возникновении мутаций или на активации различных адаптивных ответов с участием альтернативного компенсаторного сигнального пути [14, 15].

В развитие резистентности к химиопрепаратам вовлечены разнообразные молекулярные механизмы, они включают (1) усиленный вывод лекарственного препарата из клетки (2) изменения в метаболизме химиопрепарата и (3) мутации в генах-мишенях. Эпигенетические изменения и влияние локального опухолевого микроокружения также вносят значительный вклад в формирование резистентности [2-4, 16].

Некоторые исследователи связывают неудачи лечения опухолей с наличием раковых стволовых клеток, которые по своей природе весьма устойчивы ко многим терапевтическим препаратам [17]. Эта устойчивость ассоциирована с такими особенностями как высокая экспрессия белков-транспортёров токсичных веществ, активность альдегиддегидрогеназы (ALDH), экспрессия антиапоптотических белков BCL-2 и BCL-XL, усиление процессов репарации ДНК и активация таких ключевых сигнальных молекул, как, например, NOTCH или ядерный фактор NF-κB, необходимых для выживания [18-20]. Кроме этого, стволовые клетки могут находиться в покоящемся состоянии и поэтому быть устойчивыми к химиотерапии, которая преимущественно направлена на делящиеся клетки. Однако, эта область исследований сталкивается со

многими трудностями, и остается множество вопросов относительно представленности, характеристик и происхождения этих клеток. В частности, надежные маркеры стволовых клеток рака до сих пор не определены, и не известно, насколько стабилен фенотип стволовых клеток [21]. Высокая пластичность опухолей позволяет более дифференцированным клеткам возвращаться к состояниям, подобным стволовым клеткам, что может говорить о принципиальной невозможности полного уничтожения стволовых клеток в составе опухоли.

Несмотря на то, что понимание молекулярной биологии рака весьма продвинулось вперед, химиотерапия первой линии (в том числе неоадьювантная химиотерапия), используемая при раке яичника, в течение последних 15 лет осталась неизменной: это комбинация препаратов группы платины (преимущественно карбоплатин) и препараты таксанового ряда (преимущественно паклитаксел) [22]. Рецидивы, возникающие в 80% случаев серозной аденокарциномы яичника, являются прямым следствием возникновения резистентности к этим химиопрепаратам.

Одним из наиболее частых механизмов возникновения резистентности к препаратам группы платины является повышение экспрессии генов множественной лекарственной устойчивости (MDR1, ABCB1, MRP1, BCRP и других), которые эффективно выводят токсичные вещества из клеток. Кроме того, усиливается представленность ферментов, метаболизирующих химиопрепараты (например, GSTP1), появление новых мутаций в генах онкосупрессорах (p53, BRCA1/2, ATM) [15, 23, 24], отбор более агрессивных предсуществующих популяций опухолевых клеток [6], а также вызванное терапией приобретение клетками более агрессивного фенотипа *de novo* [2-4, 7, 25, 26]. Интересно, что в последнем процессе важную роль играют межклеточные взаимодействия. Несколько элегантных работ убедительно показали, что клетки, подвергающиеся апоптозу под действием терапии, секретирует молекулы, ускоряющие пролиферацию соседних, выживших опухолевых клеток [3, 4]. Однако существующие механизмы возникновения резистентности не объясняют причину такого феномена «компенсаторной пролиферации» [2-4, 27].

2 Явление компенсаторной пролиферации

Одним из важнейших феноменов, лежащих в основе возникновения резистентности может быть процесс, названный «компенсаторная пролиферация» [28-31]. Сущность этого явления заключается в том, что клетки, подвергающиеся запрограммированной клеточной гибели (апоптозу) в ответ на стресс, стимулируют

пролиферацию выживших опухолевых клеток в результате чего, гибель одних клеток приводит к появлению такого же или ещё большего числа новых раковых клеток [3, 4, 27, 32]. Интересно, что этот процесс был обнаружен при облучении радиацией имагинального диска крыльев плодовой мушки *Drosophila melanogaster*, представляющего собой скопление недифференцированных клеток личинок, которые затем развиваются в крылья взрослой особи. Было замечено, что клетки, прилегающие к зоне массивной клеточной гибели, начинали активно делиться, в результате чего взрослые крылья достигали почти нормального размера и формы [33, 34]. При этом могут быть скомпенсированы потери даже до 60% от общего количества клеток. Похожее явление наблюдалось при регенерации тканей у млекопитающих [35, 36]. По-видимому, этот процесс имеет большое значение для развития и восстановления организма [27, 37]. Таким образом, клеточная смерть выгодна при определенных условиях, в которых важную роль имеет статус развития ткани. Как правило, клетки в пролиферирующих тканях легко заменяются после повреждения ткани, тогда как клетки в дифференцированных тканях обновлять намного сложнее, поскольку эти клетки находятся в постмитотической фазе клеточного цикла и только небольшая часть клеток сможет снова вступить в клеточный цикл при потере жизненно важных клеток [37]. Однако в случае раковых заболеваний, опухолевые клетки могут использовать данный механизм как одну из возможностей для преодоления действия терапии.

Молекулярный механизм компенсаторной пролиферации основан на том, что апоптотические клетки могут секретировать во внеклеточное пространство митогенные сигналы, способствующие регенерации ткани. Такими митогенными сигналами могут служить продукты генов *Wg* (ортолог млекопитающих *Wnt*); *Dpp* (ортолог млекопитающих *BMP*); *Hh* (ортолог млекопитающих *SHH*, *INH*); *Spi* (ортолог млекопитающих *EGF*), а также фактор некроза опухоли (*TNF*) и простагландин *E2* (*PGE2*) [27]. Так, было показано, что простагландин *E2* (*PGE2*), высвобождаемый апоптотическими клетками рака молочной железы, стимулирует разрастание соседних раковых клеток после ионизирующего облучения и, таким образом, восстанавливает опухоль [4]. В другом исследовании было показано, что подвергающиеся апоптозу под действием терапии клетки рака легкого и меланомы способствуют выживаемости более резистентных раковых клеток и усиливают их способность к пролиферации и миграции за счет активации *PI3K/AKT/mTOR* сигнального пути [3]. Однако в приведенных работах были исследованы только изменения, происходящие в выживших опухолевых клетках после их инкубации с погибающими клетками. Поэтому факторы, вызывающие усиление метаболической активности клеток, остались гипотетическими. Также, важно отметить то,

что в некоторых случаях для запуска механизма компенсаторной пролиферации может быть постоянно активирована программа клеточной гибели клеток, и такие выжившие клетки могут сохранять все молекулярные особенности апоптотических клеток, однако не погибать. В таких условиях клетки продуцируют высокие уровни сигнальных молекул, которые стимулируют разрастание соседних тканей [27, 38].

3 Способы межклеточной коммуникации

3.1 Коммуникация, опосредованная белками

Классическим примером коммуникации раковых клеток со своим локальным микроокружением является ауто- и паракринная регуляция, которая опосредована секретлируемыми митогенными сигналами (сигналы, инициирующие митоз). Раковые клетки способны постоянно секретировать активирующие сигналы – различные факторы роста (IGF, PDGF, TGF α и др.), которые связываются с поверхностными рецепторами, содержащими внутриклеточные тирозинкиназные домены. Активированные таким образом тирозинкиназы запускают разветвленные сигнальные каскады, которые стимулируют прогрессию клеточного цикла, кроме того, часто такие сигналы влияют на выживаемость раковых клеток и на энергетический метаболизм. С другой стороны, опухолевые клетки могут посылать сигналы для стимулирования нормальных клеток в пределах опухоли-ассоциированной стромы, которые, в свою очередь, обеспечивают их различными факторами роста [39].

Еще одним важным для раковых клеток процессом, который индуцируется внеклеточными сигнальными молекулами белковой природы, является эпителиально-мезенхимальный переход, способствующий опухолевой прогрессии и метастазированию. Как правило, приобретение раковыми клетками мезенхимальных свойств ассоциируется с более агрессивными подтипами заболевания [40-42]. А также эпителиально-мезенхимальный переход играет важную роль в возникновении лекарственной резистентности у опухолевых клеток. Раковые клетки, находящиеся в состоянии эпителиально-мезенхимального перехода, могут поддерживать это состояние путем автономной, независимой от микроокружения стимуляции с помощью путей положительной обратной связи [43]. Среди этих паракринных сигналов хорошо изучен трансформирующий фактор роста β (TGF- β). Кроме того, имеются данные о других молекулах, способных участвовать в запуске эпителиально-мезенхимального перехода: морфогенах Wnt, Notch, Sonic hedgehog (Shh), цитокинах, и факторах роста, таких как

эпидермальный фактор роста (EGF), фактор роста фибробластов (FGF), фактор роста гепатоцитов (HGF), тромбоцитарный фактор роста (PDGF) и фактор роста эндотелия сосудов (VEGF). Во многих ситуациях программы эпителиально-мезенхимального перехода активируются в ответ на комбинацию нескольких различных паракринных сигналов [39, 44].

Фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) обычно в больших количествах присутствует в опухолевом микроокружении, в том числе в асцитах при раке яичника [12]. VEGF, а также и ряд других сигнальных молекул, таких как тромбоспондин-1 и фактор роста фибробластов (FGF) способны связываться с поверхностными рецепторами, расположенными на сосудистых эндотелиальных клетках, и стимулировать ангиогенез. Новая сосудистая сеть необходима опухолевым клеткам для получения кислорода и питательных веществ [39].

Известно, что в микроокружении раковых клеток присутствуют клетки иммунной системы. Причем среди них имеется ряд опухоль-стимулирующих воспалительных клеток, таких как макрофаги, тучные клетки и Т- и В-лимфоциты. Эти клетки помимо факторов роста секретируют различные хемокины и цитокины, которые усиливают состояние локального воспаления. Так, известно, что интерлейкин 10 (IL10) ингибирует пролиферацию Т-хелперов, препятствует созреванию дендритных клеток и ингибирует молекулы, стимулирующие Т-клетки, поэтому предполагается, что IL10 в асцитах при раке яичника помогает опухолевым клеткам ускользать от противоопухолевого иммунитета [12]. Концентрация воспалительных цитокинов, таких как IL-1 β , IL6, IL-8, IL10, значительно повышена в асцитах, образующихся при раке яичника, в сравнении с сыворотками крови тех же больных, а также коррелирует с плохим прогнозом и ответом на терапию. На моделях животных было показано, что экспрессия IL8 ассоциирована с повышенной онкогенностью и образованием асцита. IL6 не только ускоряет рост опухоли, миграцию и инвазию, но также способствует химиорезистентности и ангиогенезу. Кроме того, высокие уровни IL6 в асцитах при раке яичника ассоциированы с более короткой выживаемостью без прогрессии заболевания [45].

Чтобы понять роль межклеточной коммуникации в возникновении резистентности, необходимо также изучать изменение секретомов опухолевых клеток в процессе терапии. Одним из основных методов в данном случае является анализ протеома жидкостей, являющихся естественной средой обитания опухолевых клеток. Примером таких жидкостей являются асциты. Так, была произведена целая серия протеомных работ по изучению внеклеточной части асцитов при раке яичника [46-48] и секретомов различных раковых клеточных линий: секретомы от чувствительных и резистентных клеток [49, 50],

мезенхимальных и эпителиальных [51], от клеток с различным потенциалом к метастазированию [52], а так же с различными морфологическими особенностями [53]. Однако все эти работы были направлены на исследование секретомов клеток до лечения, а их сравнение с секретомами после химио- или радиотерапии не проводилось.

Обычно в секретоме раковых клеток идентифицируется около 1000 белков [49, 50, 54-56]. При нормальных условиях, в отсутствие стресса для секретомов раковых клеток характерно наличие белков протеасомы; белков, обладающих различными протеолитическими функциями; а также ферментов, принимающих участие в деградации/синтезе липидных компонентов. Кроме того, раковые клетки секретируют ряд белков (FAM3C; GRN; GDF15; хемокины CXCL и другие), которые играют роль в процессе воспаления и ремоделирования ткани, а также различные факторы роста (TGF- β , EGF, VEGF, IGF, BMP и др.) и цитокины (IL6, IL8, CSF и др.) [49, 50, 54-56]. Однако интересным является тот факт, что в секретоме раковых клеток начинают появляться внутриклеточные белки [8, 32, 57, 58]. Наличие внутриклеточных белков во внеклеточном пространстве представляется весьма интересным, так как недавно были опубликованы различные примеры того, что внутриклеточные белки, попадая во внеклеточное пространство, приобретают альтернативные функции [59-61]. Чтобы понимать, каким образом внутриклеточные белки, не имеющие соответствующей сигнальной последовательности, могут попадать во внеклеточное пространство, далее будут рассмотрены основные механизмы секреции белков.

3.1.1 Механизмы секреции белков

Для облегчения понимания принципов и особенностей секретомного анализа далее будет представлен обзор механизмов белковой секреции, которые обеспечивают присутствие большого количества внеклеточных белков в микроокружении как нормальных, так и раковых клеток. Существует несколько механизмов, с помощью которых эукариотические клетки могут секретировать важные молекулы во внеклеточную среду. Так, растворимые белки секретируются посредством экзоцитоза. Эти белки преимущественно синтезируются в виде белков-предшественников, которые содержат *N*-концевые сигнальные пептиды или трансмембранный домен. Это направляет их в эндоплазматический ретикулум, из которого они выходят в составе везикул, покрытых белком СОPII, и попадают в аппарат Гольджи, а затем перемещаются к клеточной мембране, где высвобождаются во внеклеточное пространство путем слияния везикул из

аппарата Гольджи с плазматической мембраной. Этот процесс белковой секреции был хорошо охарактеризован и назван классическим способом секреции [62-64].

Однако, исследования последних 15 лет показали, что белки могут быть экспортированы из клетки по механизму неклассической секреции, независимому от аппарата Гольджи. Неклассическим способом секретируются белки, которые пересекают плазматическую мембрану и выполняют свои функции во внеклеточной среде, несмотря на отсутствие сигнального пептида или трансмембранного домена. Стоит отметить, что эти белки могут содержать альтернативные сигнальные последовательности, которые могут направлять их во внеклеточное пространство.

Существует как минимум четыре типа неклассической секреции [65] (Рисунок 1). Первые три из них позволяют секретировать белки, не имеющие сигнальной последовательности:

- тип I – транслокация через мембрану с помощью пор;
- тип II – секреция с помощью ABC-транспортеров, которая предназначена для экспорта ацилированных пептидов;
- тип III – секреция на основе аутофагосом или эндосом.

Последний IV тип секреции позволяет транспортировать белки с сигнальным пептидом или трансмембранным доменом, которые направляются к плазматической мембране, не попадая в эндоплазматический ретикулум и избегая упаковки в аппарате Гольджи.

Все эти пути различаются, но имеют общие особенности. Во-первых, за небольшим исключением, все они индуцируются стрессом [66, 67]. Это важно, поскольку стресс может нарушать функциональную целостность классического пути секреции, приводя к необходимости подключения альтернативных способов секреции. Во-вторых, белки без сигнальных последовательностей, использующие типы секреции I и III, по-видимому, напрямую транслоцируются через мембрану: плазматическую мембрану для типа I и мембрану аутофагосом или эндосом для типа III. В-третьих, для секреции по типу III и IV используются периферические белки аппарата Гольджи (Golgi reassembly-stacking protein, GRASP) [66, 67].

Поскольку секреция по типу II недостаточно хорошо изучена, далее будут описаны механизмы, опосредующие неклассическую секрецию по типу I, III и IV.

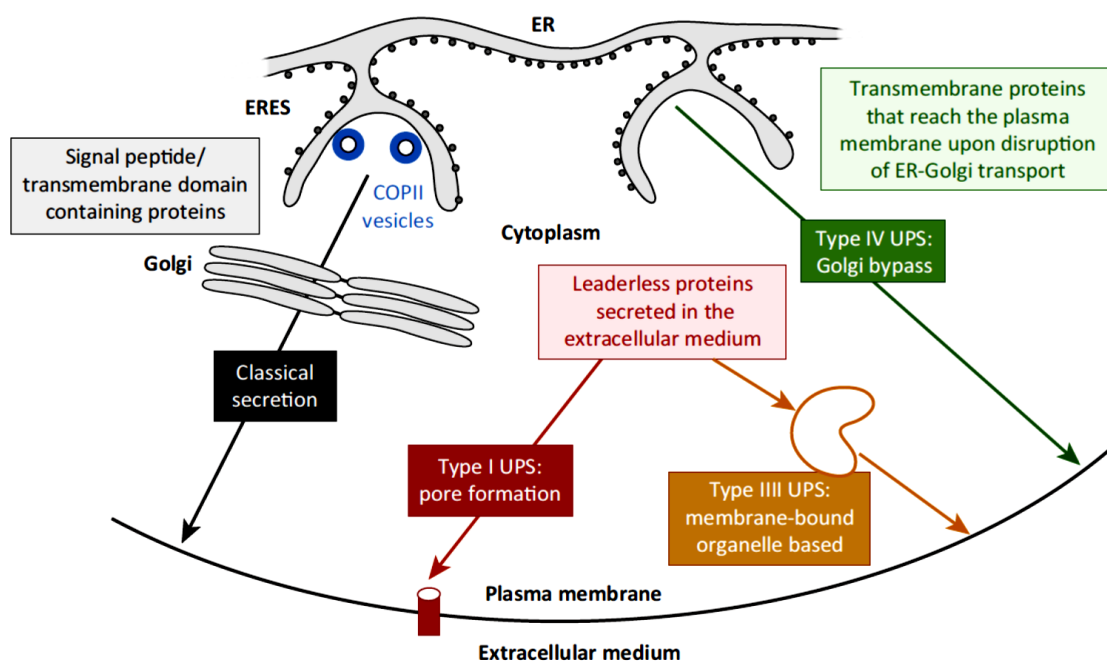


Рисунок 1 – Типы секреции белков. Белки без сигнальных последовательностей могут транслоцироваться через поры мембраны (красный цвет) или посредством органелл, ассоциированных с мембраной (коричневый цвет). Трансмембранные белки могут быть транспортированы к мембране с помощью классического пути секреции (черный цвет) или по неклассическому пути, независимому от аппарата Гольджи (зеленый цвет).

(Адаптировано из Rabouille C. et al. // Trends in cell biology, 2017)

3.1.1.1 Секреторная система типа I: образование пор в цитоплазматической мембране

Образование пор в плазматической мембране позволяет белкам без сигнальной последовательности транслоцироваться через мембрану. Порообразование является ключевым механизмом высвобождения белков без сигнальных пептидов и может регулироваться независимо или же быть обусловленным воспалением.

3.1.1.1.1 Образование липидных пор при нормальных условиях

Хотя большая часть механизмов неклассической секреции индуцируется клеточным стрессом, два белка: фактор роста фибробластов 2 (FGF2) и белок-активатор транскрипции ВИЧ (TAT) секретируются постоянно. Эти белки самостоятельно формируют липидную пору, которая позволяет им транслоцироваться через плазматическую мембрану во внеклеточное пространство (Рисунок 2). Полностью фолдированные белки FGF2 и TAT рекрутируются к внутреннему слою клеточной мембраны с помощью взаимодействия с фосфатидил-инозитол-4,5-бифосфатом (PI(4,5)P₂), которым обогащена мембрана [68, 69]. Взаимодействие FGF2 с PI(4,5)P₂

приводит к его фосфорилированию тирозинкиназой ТЕС [68]. Затем они подлежат олигомеризации, которая способствует проникновению в плазматическую мембрану и образованию поры. После олигомеризации внеклеточный диссоциированный мономер FGF2 захватывается гепарансульфатными протеогликанами. Однако непонятно, разбирается ли пора на внутренней стороне клеточной мембраны после транслокации FGF2, или же пора стабильна и позволяет перемещаться мономеру FGF2 постоянно.

Кроме того, было показано, что субъединица альфа натрий-калиевой АТФазы (АТРА1) обладает сильной аффинностью к FGF2 и также может участвовать в секреции этого белка [70].

Секреция FGF2 по неклассическому пути может использоваться для того, чтобы избежать пост-трансляционных модификаций в аппарате Гольджи. Было показано, что, если бы FGF2 секретировался по классическому типу, то он был бы функционально неактивным. Кроме того, поскольку транслокация строго зависит от фолдинга данного белка – это может представлять более строгий контроль, чем бы это обеспечивал эндоплазматический ретикулум [66, 71].

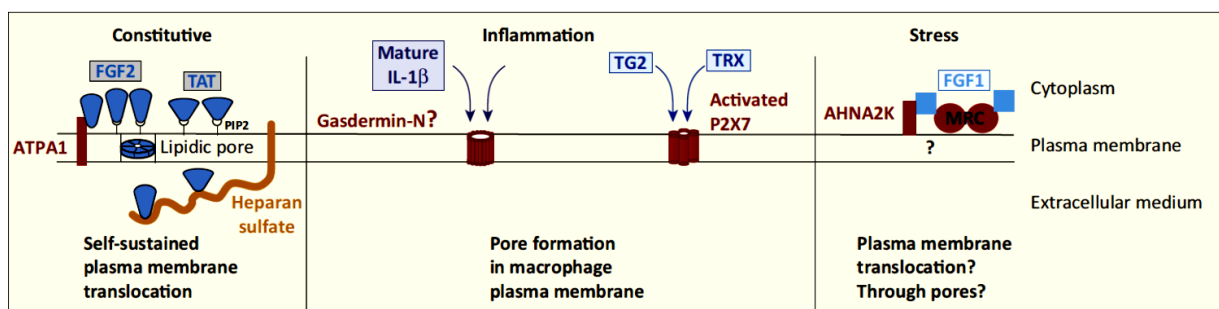


Рисунок 2 – Механизмы секреции с помощью образования пор в цитоплазматической мембране. Образование поры может происходить в постоянном режиме при нормальных условиях за счет олигомеризации FGF2 и TAT. Однако воспаление способствует секреции IL-1 β , транскламиназы 2 и тиоредоксину через разнородные поры, которые формируются в плазматической мембране, например, макрофагов. Еще одним плохо охарактеризованным процессом, индуцируемым стрессом, является транслокация FGF1 с помощью мультибелкового комплекса (multiprotein release complex, MRC). (Адаптировано из Rabouille C. et al. // Trends in cell biology, 2017)

3.1.1.1.2 Образование пор под действием воспаления

Транслокация через мембрану также может быть опосредована воспалением, которое приводит к массивному и быстрому высвобождению во внеклеточное пространство цитокинов из цитоплазмы макрофагов. Одним из наиболее тщательно изученных примеров является секреция интерлейкина-1 β (IL-1 β). В ответ на воспаление, быстро синтезируется предшественник IL-1 β и под действием каспазы-1 приобретает

зрелую форму, которая секретируется неклассическим способом, но не до конца понятно каким. По-видимому, секреция IL-1 β из макрофагов происходит по типу I. Однако IL-1 β не связывается с PIP2 и не образует поры. Вместо этого, IL-1 β проникает через плазматическую мембрану макрофагов, которая становится гиперпроницаемой перед клеточным лизисом.

Природу гиперпроницаемости можно объяснить следующим образом: подобно предшественнику IL-1 β , каспаза 1 расщепляет белок gasdermin, оставляя N-концевую половину (Gasdermin-N). Этот белковый сегмент, связываясь с PIP2, эффективно рекрутируется к плазматической мембране, где он может образовать 16 симметричных пор [72]. Предполагается, что по крайней мере на ранних стадиях воспаления цитоплазматический зрелый IL-1 β использует эти поры для секреции. Воспаление затем приводит к лизису клеток и высвобождению других цитокинов [66] (Рисунок 2).

Еще один тип пор, который образуется при воспалении, связан с пуриnergическим рецептором P2X7, через который трансглутаминаза 2 (TGM2) и тиоредоксин способны секретироваться, например, макрофагами (Рисунок 2) [73]. Интересно, что в клетках большинства злокачественных опухолей происходит чрезмерная экспрессия рецептора P2X7 [74]. Пуриnergические рецепторы представляют собой специфический класс мембранных рецепторов, которые вовлечены в несколько важных клеточных функций, таких как пролиферация и миграция стволовых клеток, активация ангиогенеза, апоптоз и секреция цитокинов [75, 76]. Эти функции плохо охарактеризованы, и влияние внеклеточного микроокружения на эти рецепторы также мало изучено. Известно, что пуриnergические рецепторы, в особенности P2X7, вовлечены в процессы хронического воспаления, а их активация происходит из-за присутствия во внеклеточной среде АТФ или аденозина [77]. Способность выделять нуклеотиды и нуклеозиды характерна для самых разнообразных клеток. Выделение этих веществ во внешнюю среду повреждёнными и умирающими клетками служит важнейшим индикатором повреждения клетки. В живых, нормально функционирующих клетках такое выделение нуклеотидов и нуклеозидов обеспечивают несколько физиологических механизмов, таких как экзоцитоз, диффузия через мембранные каналы и транспортировка переносчиками [78].

Неизвестно, зачем вышеупомянутые белки используют неклассический тип секреции. Можно предположить, что раз выделение цитокинов происходит во время острого стресса, он может нарушить функциональную целостность классического секреторного пути. Кроме того, чтобы справиться с количеством и скоростью, необходимыми для ответа на воспаление, нужно было бы хранить в одном из

компартов секреторного пути большое количество предшественника IL-1 β , что может повредить конститутивную секрецию.

Еще одним белком, который секретируется в ответ на стресс является FGF1. Этот белок принадлежит тому же семейству проангиогенных белков, что и FGF2, но в отличие от последнего, FGF1 требует образования большого мультибелкового комплекса (Рисунок 2), включающего несколько других белков без сигнальной последовательности: аннексин 2, сфингозин киназа, синаптотамин p40 и малый кальциевый белок S100A3, – которые, по-видимому, также транслоцируются [79]. Однако остается неизвестным, формирует ли этот комплекс поры, и почему он не секретируется по классическому пути.

3.1.1.2 Секреторная система типа III: секреция с использованием внутриклеточных структур

Данный тип секреции опосредован стрессом и взаимосвязан с ассоциированными с мембраной органеллами, которые теряют свои нормальные функции и становятся секреторируемыми. Этими структурами являются эндосомы и аутофагосомы [80]. Уже хорошо известно, что поздние эндосомы способны высвободить свои внутренние везикулы (экзосомы). Аутофагия – это физиологический процесс, который поддерживает клеточный гомеостаз с помощью деградации белков через лизосомный путь и метаболизма органелл. Этот процесс осуществляет набор консервативных белков, известных как белки, ассоциированные с аутофагией (autophagy-related proteins, Atg). В настоящее время роль Atg белков в неклассической секреции хорошо описана [80, 81].

Как было показано при исследованиях дрожжей [82], цитоплазматический материал для секреции может быть поглощен в аутофагосому, но в качестве альтернативы может включать и промежуточные продукты из мультивезикулярных эндосомальных телец, так как аутофагосомы и мультивезикулярные эндосомальные тельца взаимодействуют с образованием гибридных структур [83]. Аутофагия может экспортировать цитоплазматические субстраты напрямую или доставлять их в промежуточные мультивезикулярные эндосомальные тельца для последующего высвобождения посредством слияния телец с цитоплазматической мембраной. Аналогичный процесс наблюдался в созревающих ретикулоцитах, в которых LC3-положительные (LC3 – поверхностный маркер аутофагосом) мультивезикулярные эндосомальные тельца сливались с плазматической мембраной *in vitro*, и аналогичные везикулы были идентифицированы в периферической крови [84]. Таким образом,

существует ряд доказательств пересечения между процессом аутофагии и мультвезикулярными эндосомальными тельцами [85].

3.1.1.3 Секреторная система типа IV

Несмотря на то, что этот путь также активируется при стрессе, он отличается от типов секреции I и III. При таком типе секреции белки, имеющие сигнальную последовательность или трансмембранный домен, синтезируются в эндоплазматическом ретикулуме, но доставляются к цитоплазматической мембране, минуя аппарат Гольджи. Такие белки доставляются к плазматической мембране даже в присутствии брефельдина А (ингибитор везикулярного транспорта) и/или при отсутствии синтаксина 5 (опосредует транспорт белков из эндоплазматического ретикулума в аппарат Гольджи). В результате, эти белки, проходя через эндоплазматический ретикулум, приобретают необходимые модификации гликозилирования, но не процессируются ферментами в аппарате Гольджи [66, 86].

Можно подвести итог, что исследование неклассических способов секреции белков весьма актуально и позволяет открывать новые пути движения белков к плазматической мембране и их высвобождения во внеклеточное пространство. Это разнообразие, несомненно, продиктовано природой самих секретируемых белков, а также условиями, вызывающими их высвобождение (например, стресс), и типом клеток, однако эти вопросы недостаточно исследованы. Интересным представляется тот факт, что неклассическая секреция белков во внеклеточное пространство может стать новым уровнем пост-трансляционной регуляции, в результате чего функция белка может зависеть от клеточной локализации.

3.2 Коммуникация, опосредованная метаболитами

Следует отметить, что важными сигнальными молекулами могут быть не только белки, но и низкомолекулярные метаболиты.

Теперь совершенно точно установлено, что «метаболическое репрограммирование» является важной особенностью раковых клеток [39]. Опухолевые клетки имеют общее свойство неконтролируемой пролиферации, и для этого они должны эффективно генерировать энергию и компоненты биомассы. Необходимые изменения в метаболическом фенотипе напрямую зависят от активации онкогенов, потери опухолевых супрессоров и ограничений, налагаемых микроокружением опухоли (недостаток

кислорода и питательных веществ) [87]. Раковые клетки обладают гибким метаболизмом, который помогает противостоять неблагоприятным условиям и расти в агрессивной окружающей среде. Первыми адаптивными событиями в метаболизме опухоли являются усиление поглощения глюкозы и использование гликолиза, приводящее к увеличению продукции лактата (то есть эффект Варбурга) [88]. Для раковых клеток также характерно потребление глутамина, который обеспечивает углеродом и азотом, необходимыми для биосинтеза аминокислот, нуклеотидов и липидов.

В настоящее время все большее внимание посвящается биоактивным липидам и жирным кислотам как посредникам между раковыми клетками и стромой [89]. Активно пролиферирующие раковые клетки имеют сильную потребность в липидах и холестерине, которую они удовлетворяют либо за счет увеличения потребления экзогенных липидов, либо за счет активации их эндогенного синтеза (липогенез и синтез холестерина, соответственно) (Рисунок 3). Излишние липиды и холестерин в раковых клетках хранятся в липидных каплях. В настоящее время повышенное количество этих липидных капель считается признаком агрессивности рака [90-92]. Кроме того, было показано, что раковые клетки, обогащенные липидными каплями, были более резистентными к химиотерапии [93]. Выживаемость и метастазирование раковых клеток также зависят от захвата и потребления экзогенных жирных кислот, причем последнее происходит через β -окисление жирных кислот даже в клетках с высокой липогенной активностью (Рисунок 3). β -окисление жирных кислот является одним из самых важных биоэнергетических путей в опухолях. Зависимость раковых клеток от β -окисления жирных кислот дополнительно усиливается в условиях дефицита питательных веществ и кислорода. В анаэробных условиях вместо цикла Кребса функционирует его окислительная ветвь до альфа-кетоглутарата (реакции 1, 2, 3). При этом много энергии не запасается и цикл поставляет преимущественно интермедиаты для клеточных синтезов.

Липиды охватывают обширный класс биомолекул с уникальной химической структурой. Липиды различаются по показателю длины цепи жирных кислот, числа и расположения двойных связей, а также структур скелета (глицериновых и сфингоидных оснований). Функции этого разнообразия липидов до конца не выяснены. Однако было описано, что липиды выполняют множество биохимических функций во время развития рака. Исторически они рассматривались как пассивные компоненты клеточных мембран, где они образуют липидные рафты, которые облегчают рекрутирование белка и, таким образом, белок-белковые взаимодействия, способствующие передаче сигнала. Важные изменения в составе липидов (насыщенные против ненасыщенных) и их обилие сильно изменяют текучесть и белковый состав мембраны. Например, увеличение насыщенных

фосфолипидов заметно изменяет сигнальную трансдукцию, защищает раковые клетки от окислительного повреждения, такого как перекисное окисление липидов, и потенциально ингибирует поглощение химиотерапевтических препаратов. Помимо их структурных функций, липиды управляют каскадами трансдукции сигнала, а также могут быть расщеплены на биоактивные медиаторы липидов, которые регулируют различные канцерогенные процессы, включая рост клеток, миграцию клеток и образование метастазов [89].

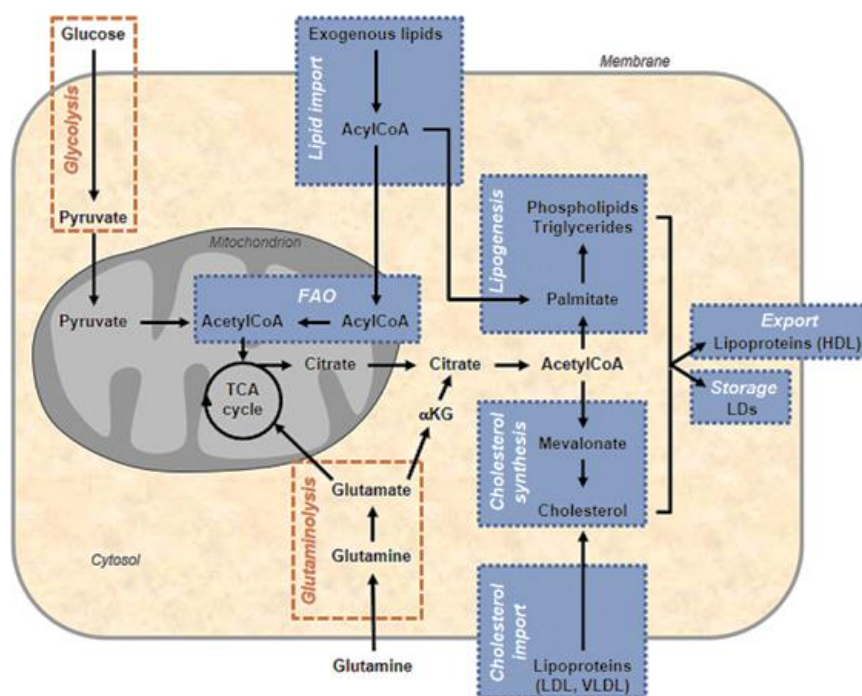


Рисунок 3 – Упрощенная схема основных измененных метаболических путей липидов в раковых клетках. Липидная метаболическая сеть (синяя) включает в себя импорт/экспорт и β -окисление жирных кислот (fatty acid β -oxidation, FAO), а также пути синтеза *de novo*, такие как липогенез (то есть синтез триглицеридов и фосфолипидов) и синтез холестерина. Глюкоза и/или цитрат, полученный из глутамин, обеспечивают повышенным уровнем гликолиза и/или глутаминолиза (оранжевый) и являются общими предшественниками липогенеза и синтеза холестерина. Раковые клетки могут также захватывать экзогенный холестерин, переносимый липопротеинами низкой плотности (LDL) и липопротеинами очень низкой плотности (VLDL), для удовлетворения их потребности в холестерине. Когда холестерин, фосфолипиды и триглицериды находятся в избытке в опухолях, они экспортируются из клетки в виде липопротеинов высокой плотности (HDL) или локально хранятся в липидных каплях (LD). Экзогенные жирные кислоты, поглощенные раковыми клетками, расщепляются в митохондриях, чтобы получить строительные блоки в результате β -окисления жирных кислот. TCA – цикл трикарбоновых кислот, α KG, α -кетоглутарат. (Адаптировано из Beloribi-Djefaflija S. et al.// Oncogenesis, 2016)

Большинство заболеваний, включая нарушения обмена веществ, иммунной и центральной нервной системы, а также рак, являются последствиями изменения ферментов обмена липидов и их путей. Это иллюстрирует фундаментальную роль липидов в поддержании гомеостаза мембраны и нормальной функции в здоровых клетках.

Опухолевое микроокружение, которое формируется компонентами внеклеточного матрикса и многочисленными стромальными клетками, включая опухоль-ассоциированные фибробласты, инфильтрирующие иммунные клетки, адипоциты, нервные клетки, сосудистые / лимфатические эндотелиальные клетки, составляет до 90% от массы опухоли [94].

Было продемонстрировано, что молекулярный диалог между раковыми клетками и соседними опухоль-ассоциированными фибробластами или иммунными клетками поддерживает рост опухоли и ее прогрессирование. В настоящее время все более признается центральная роль, которую играют биоактивные липиды и жирные кислоты как посредники между раковыми клетками и стромой [89].

3.2.1 Коммуникация раковых клеток посредством свободных жирных кислот

Многочисленные опухоли растут вблизи адипоцитов или метастазируют в среду обитания, богатую адипоцитами. Например, метастатические раковые клетки яичников часто появляются в жировой ткани сальника, которая является важным резервуаром для триглицеридов [95]. Гидролиз этих триглицеридов обеспечивает появление и высвобождение свободных жирных кислот, которые захватываются раковыми клетками через специальный белок 4, связывающий жирные кислоты (FABP4) и используются в качестве источника энергии метастатическими раковыми клетками яичника (Рисунок 4) [95]. Аналогичным образом, метастатические клетки рака предстательной железы могут получать жирные кислоты из адипоцитов [96]. Этот «диалог» между адипоцитами и раковыми клетками является адаптивным метаболическим процессом, присущим раковым клеткам, чтобы в полной мере использовать липиды, хранящиеся в клетках опухолевого микроокружения.

Транслокация жирных кислот из стромальных клеток в раковые может быть опосредована липопротеинами, сывороточным альбумином и даже внеклеточными везикулами [97, 98]. Эти везикулы могут также служить носителями жирных кислот и поглощаться клетками-реципиентами (Рисунок 4). Везикулы, как и родительские клетки, в большей степени обогащены насыщенными жирными кислотами, чем моно- и полиненасыщенными жирными кислотами; последняя группа по большей части представлена арахидоновой кислотой, предшественником эйкозаноидов (простагландинов и лейкотриенов) [99].

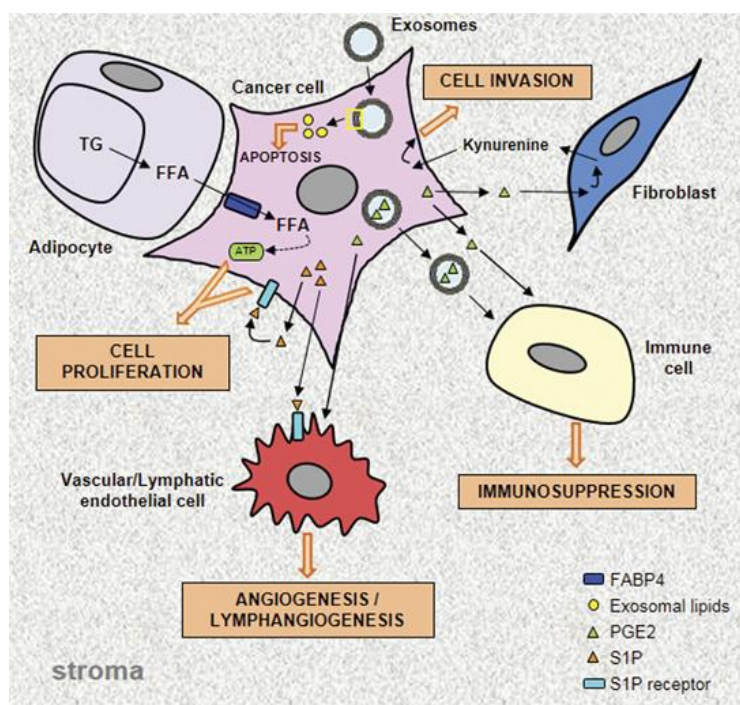


Рисунок 4 – Коммуникация опухолевых клеток с микроокружением (стромой). Схематическое изображение обмена липидов между раковыми клетками и различными типами клеток, обнаруженных в опухолевом микроокружении (TG – триглицериды; FFA – свободные жирные кислоты; PGE2 – простагландин; S1P – сфингозин-1-фосфат). (Адаптировано из Beloribi-Djefaflija S. et al. // Oncogenesis, 2016)

3.2.2 Коммуникация раковых клеток посредством простагландинов

Увеличение уровня простагландинов в раковых клетках не только способствует росту опухоли в паракринном режиме, но и координирует сложные взаимодействия между опухолевыми клетками и окружающими стромальными клетками. Показано, что такой способ коммуникации позволяет избежать атаки иммунной системы, подавляя иммунный ответ (Рисунок 4) [100]. Например, было показано, что простагландин E2 (PGE2) в составе экзосом из клеток рака молочной железы, индуцирует активацию супрессорных клеток миелоидного происхождения и дифференцировки моноцитов в макрофаги-супрессоры, которые, в свою очередь, способствует развитию опухоли [101]. Кроме того, было обнаружено, что PGE2 способствует дифференцировке моноцитов в опухоль-ассоциированные супрессирующие макрофаги при раке шейки матки [102]. Также была продемонстрирована проангиогенная активность PGE2, секретированного различными злокачественными опухолями [100, 103]. Простагландины, секретируемые раковыми клетками, экспрессирующими циклооксигеназу-2 (COX-2, фермент, ограничивающий скорость синтеза простагландинов), инициируют миграцию эндотелиальных клеток *in vitro* и неоваскуляризацию *in vivo* [103]. Такой эффект опосредован фосфорилированием рецептора эпидермального фактора роста EGFR и

активацией PI3K/AKT/mTOR сигнального пути [104]. Недавно была продемонстрирована коммуникация через PGE2 между клетками рака молочной железы и опухоль-ассоциированными фибробластами. Опухолевый PGE2 активирует в фибробластах секрецию катаболита триптофана – кинуренина, который, в свою очередь, увеличивает инвазивность раковых клеток (Рисунок 4) [105].

3.2.3 Производные сфинголипидов как медиаторы коммуникации между раковыми и стромальными клетками

Еще один биоактивный липид, сфингозин-1-фосфат, секретируемый раковыми клетками, стимулирует ангиогенез и лимфангиогенез через связывание со сфингозин-1-фосфатным рецептором 1, а также облегчает опухолевый рост и образование метастазов (Рисунок 4) [106]. Кроме того, высокие уровни внеклеточного сфингозин-1-фосфата, индуцированные избыточной экспрессией регуляторной сфингозинкиназы, повышают миграцию и увеличивают эффективность образования сосудов при совместном культивировании раковых клеток с лимфатическими эндотелиальными клетками [107].

Вместе эти данные подчеркивают ключевую роль липидов и их секреции в межклеточной коммуникации, которая важна для пролиферации и распространения опухолевых клеток [89].

3.3 Циркулирующие РНК

Последние данные, полученные при исследовании транскрипционных профилей физиологических жидкостей пациентов с различными видами рака, показали, что во внеклеточной среде различных жидкостей опухолевых больных присутствует большое количество коротких некодирующих РНК [108, 109]. Ранее было показано, что эти РНК инкапсулированы во внеклеточные везикулы (микровезикулы и экзосомы) для защиты их от деградации нуклеазами. Однако это не единственный способ существования РНК во внеклеточном пространстве. Несколько работ продемонстрировало, что внеклеточные микроРНК, не ассоциированные с везикулами, присутствуют в плазме крови в комплексе с белком Ago2 (ключевой белок комплекса, обеспечивающего сайленсинг генов по механизму РНК-интерференции) [110, 111]. Некоторые микроРНК защищены от деградации в кровотоке благодаря ассоциации с липопротеинами высокой плотности [112]. И, наконец, Wang и др. идентифицировали 12 различных РНК-связывающих белков, которые могут формировать комплексы с микроРНК и экспортировать их из раковых

клеток [108]. Однако существуют доказательства наличия во внеклеточном пространстве и других форм РНК, таких как рибосомные РНК (рРНК), транспортные РНК (тРНК), малые ядерные РНК (мяРНК) и малые ядрышковые РНК (мяоРНК). В дополнение к этому, анализируя, асциты пациенток с аденокарциномой яичников, образовавшиеся после нескольких курсов химиотерапии, а в качестве контрольных образцов – асциты пациенток с циррозом, мы впервые обнаружили, что мяРНК, принадлежащие минорной сплайсосоме, а также белки, с которыми они ассоциированы, детектировались исключительно в опухолевых асцитах [8]. При анализе РНК, циркулирующих в крови здоровых доноров и пациентов с раком легкого, было обнаружено, что в образцах плазмы крови пациентов с опухолью был повышен уровень некоторых мяоРНК [113].

В настоящее время циркулирующие РНК рассматриваются по большей части с точки зрения диагностического потенциала. Функции и механизмы действия экзогенных РНК, поглощенных раковыми клетками, изучались исключительно на примере микроРНК, находящихся в составе везикул. Так, было показано, что поглощенные клетками экзосомные микроРНК, способны влиять на прогрессию заболевания, стимулировать ангиогенез и способствовать метастазированию рака. Функции экзосомных микроРНК, в целом, относятся к классической отрицательной регуляции экспрессии генов-мишеней. Например, экзосомная miR105, секретлируемая клетками рака молочной железы, понижала экспрессию гена ZO-1 в эндотелиальных клетках, что приводило к нарушению плотных контактов и способствовало метастазированию в легкие и мозг [114]. Экзосомная miR92a, секретлируемая клетками хронического миелолейкоза K562, значительно понижала экспрессию гена-мишени интегрин $\alpha 5$ в эндотелиальных реципиентных клетках, тем самым повышая клеточную миграцию и способствуя образованию сосудов [115]. Кроме того, было показано, что miR211, транспортируемая меланосомами из клеток меланомы, понижала в реципиентных клетках фибробластов экспрессию гена-онкосупрессора IGF2R и, таким образом, активировала каскад митоген-активированных протеинкиназ [116]. Однако стоит отметить, что при изучении функций экзосомных микроРНК, сложно исключить влияние на клетки-реципиенты и других компонентов везикул, таких как белки и липиды.

Однако мы заинтересовались изучением функций и молекулярных механизмов, в которые могут быть вовлечены внеклеточные формы малых ядерных РНК при поглощении их клетками-реципиентами. мяРНК и мяоРНК участвуют в ключевых процессах созревания клеточных РНК. мяРНК являются каталитическими и структурными компонентами минорной и мажорной сплайсосом, проводящих сплайсинг пре-мРНК [117]. мяоРНК входят в состав рибонуклеопротеидных комплексов, осуществляющих

пост-транскрипционную модификацию нуклеотидов рРНК [118]. Несмотря на недостаток информации о функциях экзогенных РНК, хорошо описана роль внутриклеточных форм мяРНК и мяоРНК в развитии и прогрессии различных типов рака [119-121]. Так, в человеческих и мышинных клетках рака молочной железы было обнаружено специфичное повышение экспрессии ряда генов, кодирующих мяоРНК. Уровень экспрессии мяоРНК, как и других регуляторных РНК, может различаться не только для разных типов раковых клеток, но и на разных стадиях развития онкологического заболевания. Так, экспрессия генов ряда мяоРНК увеличивается в клетках рака простаты на поздних стадиях развития опухоли при переходе к метастазированию [122]. Результаты опубликованных исследований указывают на то, что мяоРНК могут принимать активное участие в процессах развития опухоли. При этом известно, что в раковых клетках биогенез рРНК происходит быстрее, чем в нормальных, поэтому можно предположить, что увеличение уровня мяоРНК необходимо для ускорения процессов созревания рРНК, сборки рибосом и синтеза белков для быстрого развития клеток опухоли.

Относительно небольшое количество работ посвящено изучению роли мяРНК минорной и мажорной сплайсосом в прогрессии опухолей. Имеются интересные данные, что уровни Ubatac мяРНК могут быстро повышаться в опухолевых клетках при активации каскада митоген-активируемых протеинкиназ, которые стабилизируют Ubatac мяРНК, в результате чего повышается экспрессия сотен генов, содержащих минорные интроны, которые до этого были супрессированы [119]. Продуктами этих генов являются белки, участвующие в таких процессах, как апоптоз, регуляция клеточного цикла, ответ клетки на стресс, активация везикулярного транспорта. Известно, что под влиянием внешнего воздействия в клетках млекопитающих может изменяться локализация ядерных форм РНК. Показано, например, что при действии насыщенных жирных кислот в клетках яичника хомяка СНО происходит накопление U32a, U33 и U35a РНК не в ядрах, а цитоплазме клеток [123]. Аналогичный эффект наблюдается при обработке кардиомиоцитов крысы доксорубицином [124].

Таким образом, имеющиеся к настоящему времени данные позволяют заключить, что при онкологических заболеваниях человека происходит достоверное изменение уровня отдельных малых регуляторных РНК не только внутри онкотрансформированных клеток, но и во внеклеточном пространстве физиологических жидкостей человека. Остается совершенно не изученным вопрос, с какой целью опухолевые клетки экспортируют во внеклеточное пространство различные типы циркулирующих РНК, в том числе мяРНК и мяоРНК.

3.4 Внеклеточные везикулы

Среди большого разнообразия механизмов передачи информации от клетки к клетке, можно особенно выделить межклеточную передачу сигналов посредством внеклеточных везикул. Обычно термином «внеклеточные везикулы» описывают крайне гетерогенную группу небольших (50-1000 нм) мембранных пузырьков, находящихся во внеклеточной среде и переносящих некоторые внутриклеточные компоненты [125]. Важно отметить, что, хотя ранее предполагалось, что внеклеточные везикулы неспецифически захватывают часть содержимого цитоплазмы, в последнее время убедительно доказано, что перед попаданием во внеклеточные везикулы, молекулы тщательно сортируются, и, таким образом, внеклеточные везикулы переносят не случайные компоненты, а именно то, что должно быть экспортировано из клетки [126]. Типы внеклеточных везикул преимущественно отличаются по способу биогенеза и выделяют, в основном, экзосомы, микровезикулы и апоптотические тельца.

Экзосомы имеют эндосомальное происхождение и представляют собой довольно однородную популяцию размером от 30 до 120 нм [127]. Эти везикулы Эти везикулы секретируются клетками различных типов и присутствуют практически во всех биологических жидкостях. Главными компонентами мембраны экзосом являются липиды и белки, входящие в состав липидных рафтов. Внутреннее почкование эндосомальных мембран приводит к накоплению интралюминальных везикул (в будущем, экзосом) в больших мультивезикулярных тельцах. Экзосомы высвобождаются из клетки, когда мультивезикулярные тельца сливаются с плазматической мембраной [128] (Рисунок 5).

В отличие от экзосом, микровезикулы (или эктосомы) напрямую высвобождаются из цитоплазматической мембраны путем выпячивания мембраны и отпочковывания, поэтому маркеры на поверхности мембран микровезикул сходны с маркерами мембраны родительской клетки [129]. Микровезикулы могут секретироваться клетками различных типов, однако при каком-либо стрессовом воздействии скорость их секреции резко возрастает. По этой причине микровезикулы представляют собой весьма гетерогенную популяцию везикул размером от 100 до 1000 нм [130].

Еще одним типом секретируемых везикул являются апоптотические тельца. Они формируются на поздних этапах апоптоза и высвобождаются погибающими клетками путем выпячивания плазматической мембраны и отпочковывания. Апоптотические тельца являются самыми крупными из внеклеточных везикул и достигают размеров от 1 до 5 мкм. В отличие от других везикул, апоптотические тельца могут транспортировать не только белки и различные типы РНК, но также и целые органеллы [131]. Долгое время

считалось, что секреция апоптотических телец облегчает удаление апоптотического дебриса. Однако недавно было показано, что сортировка внутриклеточного содержимого в апоптотические тельца происходит не случайным образом, так как в этих везикулах отсутствует ядерное содержимое погибающих клеток [132].

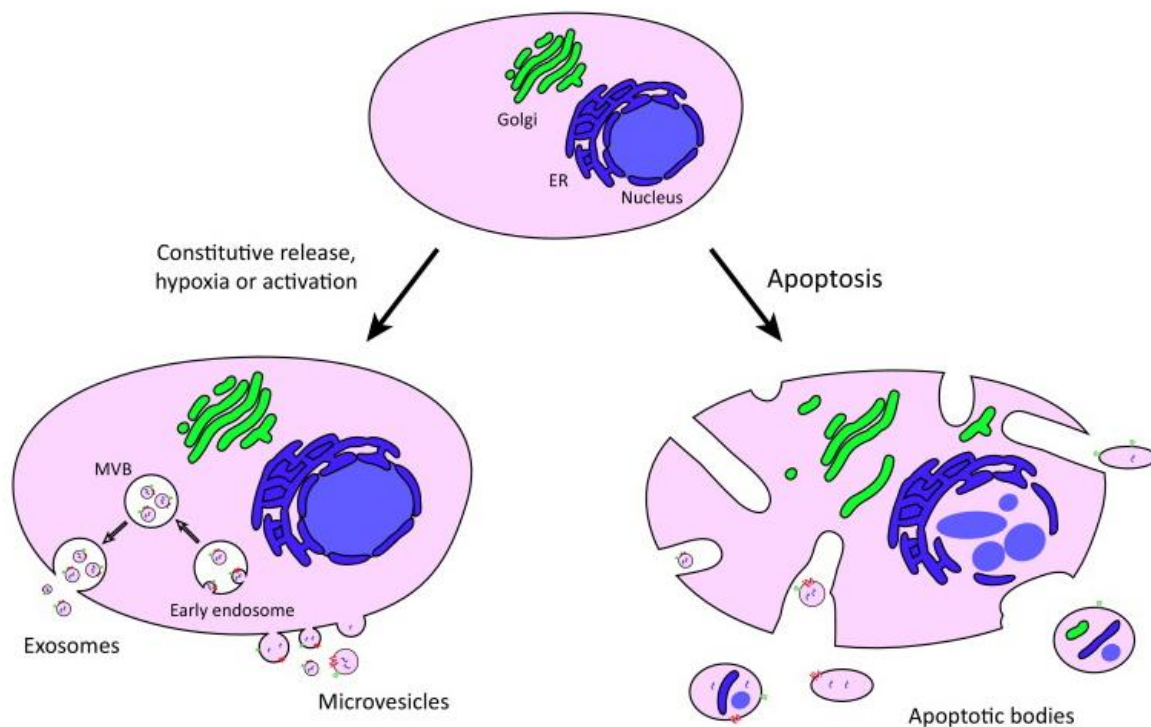


Рисунок 4 – Основные типы внеклеточных везикул, секретируемых опухолевыми клетками. (Адаптировано из Vaderet P. et al.// Trends Mol Med., 2015)

Принципиальное отличие этого типа межклеточной коммуникации от всех остальных заключается в том, что с помощью внеклеточных везикул клетки могут обмениваться любыми типами молекул, начиная от небольших липидов и микроРНК и заканчивая крупными белками, мРНК и даже фрагментами геномной ДНК и транспозонами [133]. Например, было показано, что глиальные клетки способны с помощью внеклеточных везикул передавать свои рибосомы повреждённым аксонам нейронов, чтобы ускорить их регенерацию [134]. Однако, зачастую оказывается, что процессы, которые являются крайне полезными при нормальной работе организма, начинают нести существенный вред, когда их используют опухолевые клетки, и внеклеточные везикулы здесь не стали исключением. Многими авторами было показано, что внеклеточные везикулы, производимые опухолевыми клетками, ускоряют рост опухоли, а также способствуют миграции и метастазированию раковых клеток [135, 136]. Однако, несмотря на большое количество работ, посвящённых этой тематике, механизм действия везикул до сих пор не ясен. Сейчас внимание учёных в основном приковано к

микроРНК или специфическим белкам [137], переносимым внеклеточными везикулами от опухолевых клеток. Однако имеются работы, показывающие транспорт рибосом в составе везикул [134].

Данная работа станет первым исследованием, предполагающим, что эффект внеклеточных везикул, экспортируемых опухолевыми клетками, может быть связан с наличием в них сплайсосом – крупных рибонуклеопротеидных комплексов, а не отдельных молекул белков или микроРНК [2, 8]. Хотя эта гипотеза ни разу не была высказана ранее, она кажется нам весьма правдоподобной, если принимать во внимание возможность транспорта рибосом в составе везикул [134].

4 Использование омиксных технологий в изучении межклеточной коммуникации

Использование геномных, протеомных и метаболомных технологий привело к значительному увеличению знаний о новых генах и сигнальных сетях, которые изменяются в раковых тканях по сравнению с нормальными, а также определяют чувствительность опухоли к конкретному типу химиотерапии. Кроме того, использование высокопроизводительных технологий в сочетании с биоинформатикой и подходами системной биологии способствовало идентификации молекулярных сигнатур и генотипов, которые предсказывают реакцию опухоли на определенные лекарства. Кроме того, такие подходы могут выявить новые терапевтические мишени для преодоления лекарственной устойчивости.

4.1 Протеомные технологии в изучении онкологических заболеваний

В последние годы при исследовании онкологических заболеваний большое внимание уделяется использованию протеомных технологий анализа биологических жидкостей, тканей и клеток. Такие подходы, в большинстве случаев, основаны на сравнении белковых или пептидных профилей образцов исследуемого материала, полученных от пациентов с каким-либо онкологическим заболеванием и здоровых доноров. Поскольку динамический диапазон концентраций белков в биологических жидкостях человека превышает 10 порядков [138] (Рисунок 6), это значительно затрудняет протеомный анализ, так как существующее оборудование способно детектировать белки, динамический диапазон концентраций которых составляет не более 5-6 порядков величин. В связи с этим, для анализа низко-представленных компонентов

биологических жидкостей используют различные методы их предварительного фракционирования и обогащения без потери представленности.

Чтобы упростить сложный состав биологических жидкостей, существует большое количество способов фракционирования белков: хроматография, электрофорез, изоэлектрофокусирование, центрифугирование, ультрафильтрация [48, 139]. Так как эти методы не решают проблему наличия высоко-представленных белков в образцах, широкую популярность приобрели методы деплеции с применением аффинных лигандов к некоторым мажорным белкам, присутствующим в биологических жидкостях [140]. Тем не менее, этот метод имеет известные ограничения, такие как потеря низко-представленных белков, ассоциированных с мажорными белками, и сильное разбавление обедненного образца [141].

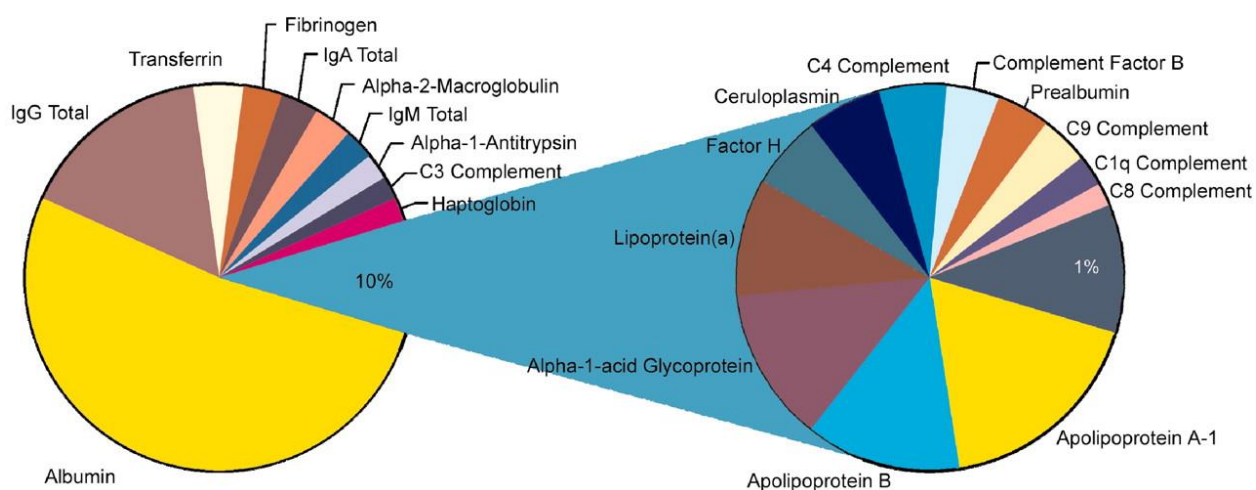


Рисунок 6 – Круговая диаграмма, представляющая относительное распределение представленности белков в плазме крови человека. Двадцать два белка составляют 99% от общей концентрации белка в плазме крови. (Адаптировано из Radhakrishna S. et al.// Mol Cell Proteomics, 2003)

Относительно недавно была разработана технология снижения динамического диапазона концентраций белков, связанная с использованием комбинаторных пептидных лигандных библиотек [141], которая облегчает глубокий протеомный анализ. Такие комбинаторные библиотеки содержат множество полимерных частиц, несущих на своей поверхности большое количество копий коротких уникальных пептидных последовательностей. В результате инкубации белковой смеси с комбинаторными пептидными лигандными библиотеками, высоко-представленные белки быстро насыщают все комплементарные им участки, в связи с этим лишь небольшая часть таких белков связывается с частицами, остальная масса элиминируется в результате промывок, а низко-представленные белки преимущественно концентрируются на частицах (Рисунок 7). Таким образом, диапазон

концентраций становится более узким, и происходит обогащение низко-представленных белков [141].

Одним из широко используемых подходов для анализа белков сложных биологических смесей и поиска потенциальных биомаркеров заболеваний является двумерный электрофорез в полиакриламидном геле (2D-PAGE) и двумерный электрофорез в полиакриламидном геле с дифференциальным окрашиванием (2D-DIGE). Однако здесь необходимо отметить, что анализ таких сложных белковых смесей, каковыми, например, являются плазма/сыворотка крови и асциты, с использованием 2D-PAGE и 2D-DIGE не слишком эффективны, поскольку позволяют идентифицировать только наиболее представленные белки.

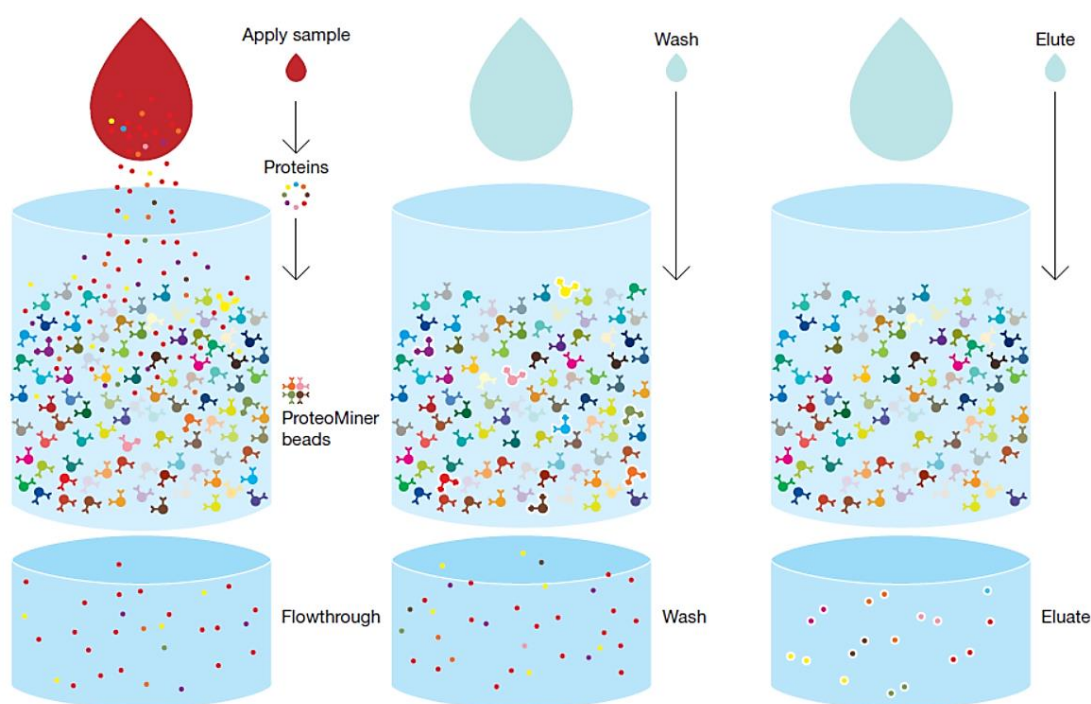


Рисунок 7 – Схема деплеции плазмы крови с помощью комбинаторных пептидных лигандных библиотек. (Адаптировано из Paulus A. et al. // Bio-Rad Laboratories Bulletin 5632)

Другим часто используемым в биомаркерных исследованиях подходом является MALDI/SELDI профилирование белков биологических жидкостей [142-145]. Основными недостатками этого подхода является плохая аналитическая воспроизводимость метода [146-149] и отсутствие биологически значимой интерпретации наблюдаемых различий в интенсивности/площади паттерна пиков, различающих два сравниваемых физиологических состояния. В настоящее время для крупномасштабных протеомных исследований преимущественно используется тандемная масс-спектрометрия, сопряженная с высокоэффективной жидкостной хроматографией (LC-MS/MS), с предварительным интенсивным фракционированием исследуемого биологического

образца [46-48, 139, 146-148, 150]. Стратегия применения этого подхода для биомаркерных исследований может быть чрезвычайно разнообразной. Так, например, в некоторых работах поиск биомаркеров рака яичников сводился к исключению высокопредставленных и внутриклеточных белков из списка белков, идентифицированных в опухолевых асцитах [47, 139]. В других работах поиск биомаркеров был основан на сравнении протеомов асцитов пациенток с аденокарциномой яичника и пациенток с доброкачественными новообразованиями с дальнейшим количественным анализом выбранных потенциальных биомаркеров [46, 48]. Но в клинической практике главными методами диагностики рака яичника по-прежнему является трансвагинальное ультразвуковое обследование и анализ циркулирующих в крови лишь нескольких онкомаркеров: cancer antigen 125 (CA125), human epididymis protein-4 (HE4), а также мультипараметрический тест OVA1, который измеряет концентрацию в крови четырех онкомаркеров CA125, β 2-микроглобулин, трансферрин и аполипопротеин A1. Тест OVA1 используется преимущественно для того, чтобы оценить злокачественность опухоли, уже имеющейся в перитонеальной полости пациентки. Два другие онкомаркера используются для мониторинга прогрессии заболевания и оценки эффективности лечения, но при этом они не являются высокоспецифичными для рака яичника и дают большой процент ложноположительных результатов [151]. Ввиду отсутствия адекватного скрининга и в связи с тем, что данный тип рака на ранних стадиях протекает бессимптомно и выявляется, как правило, когда опухоль распространяется за пределы органа, рак яичника по показателю летальности среди других видов рака женской репродуктивной системы находится на первом месте.

4.2 Метаболомные технологии в изучении онкологических заболеваний

Метаболомика рака, основанная на крупномасштабном профилировании метаболитов в образцах внутриклеточных и внеклеточных биологических жидкостей, стала активно развивающимся методом исследования онкологических заболеваний. Метаболиты являются конечными продуктами клеточного метаболизма, и изменение их концентраций отражает функциональный статус организма [152]. Уровни метаболитов отражают результаты генной и пост-трансляционной регуляции, а также взаимодействий различных метаболических путей [152-154]. Нарушения в биохимических путях приводят к изменениям концентраций метаболитов, что позволяет рассматривать эти низкомолекулярные компоненты биологических жидкостей в качестве потенциальных биомаркеров онкологических заболеваний [152].

Метаболомика, подобно другим омиксным технологиям, как правило, используется для идентификации биомаркеров и оценки эффективности медицинского вмешательства при лечении опухоли. Среди опубликованных данных по метаболомам биологических жидкостей пациенток с аденокарциномой яичника, нам удалось найти работы, в которых описано только использование метаболомного анализа мочи и сывороток крови пациенток с аденокарциномой яичников для поиска маркеров данного заболевания, при этом метаболиты, содержащиеся в асцитических жидкостях, совершенно не изучены [155-157].

В настоящее время в метаболомных исследованиях используется несколько типов анализа: (а) метаболомный фингерпринтинг, (б) метаболомное профилирование, (в) целевой изотопный анализ, который концентрируется на конкретном сегменте метаболома, анализируя при этом несколько выбранных метаболитов, принадлежащих конкретному метаболомному пути [158].

Метаболомный фингерпринтинг классифицирует биологические образцы на основе паттернов, формируемых количественными характеристиками входящих в них метаболитов. Данный подход изначально направлен не на идентификацию метаболитов, а на сравнительный анализ формируемых ими паттернов, которые претерпевают изменения при болезни, внешнем воздействии на организм или при генетических аномалиях. При масс-спектрометрическом анализе паттерн биологического образца формируется набором масс метаболитов и интенсивностью масс-спектрометрических пиков. Если перед масс-спектрометрическим анализом используется хроматография, то в формировании паттерна может принимать участие время задержки метаболита на хроматографической колонке [158]. Следует отметить, что при метаболомном фингерпринтинге охватывается максимально широкий круг метаболитов.

Метаболическое профилирование подразумевает количественный анализ метаболитов, относящихся к одному химическому классу веществ или определенному биохимическому пути, который проводится с целью поиска биомаркеров заболеваний, исследования целевых групп метаболитов, диагностики или поиска мишеней для воздействия лекарств.

Для метаболомного анализа используются следующие технологические платформы: ядерный магнитный резонанс (ЯМР), инфракрасная спектроскопия на основе преобразования Фурье и масс-спектрометрия в сочетании с различными методами разделения или с использованием прямого введения образца. Большим преимуществом ЯМР является его высокая пропускная способность для фингерпринтинга, минимальные требования к подготовке образца, недискриминирующая и неразрушающая природа метода. Однако с помощью такого подхода можно детектировать только средне- и

высоко-представленные метаболиты в образцах, а идентификация индивидуальных метаболитов на основе сигналов химического сдвига, вызывающих кластеризацию образца в многофакторном анализе, затруднена в сложных смесях. Использование в метаболомике масс-спектрометрии предполагает количественный анализ с высокой селективностью и чувствительностью и потенциал для идентификации метаболитов. Комбинация масс-спектрометрии с различными методами разделения уменьшает сложность масс-спектров благодаря разделению метаболитов во времени, обеспечивает изобарное разделение и позволяет получать дополнительную информацию о физико-химических свойствах метаболитов. Однако, технология, основанная на масс-спектрометрии, обычно требует стадии пробоподготовки, которая может вызвать потерю части метаболитов, и в зависимости от устройства для ввода пробы и способа ионизации будут идентифицироваться специфические классы метаболитов. Поэтому для крупномасштабного метаболомного профилирования желательно параллельное применение нескольких технологий, например, масс-спектрометрия, сопряженная с газовой (GC-MS) и высоко-эффективной жидкостной (LC-MS) хроматографией [159]. Метод GC-MS пользуется преимуществом благодаря его нечувствительности к малым отклонениям и низкой чувствительности к интерференции матричных масс-спектров (в частности, к супрессии ионов). Кроме того, надежные общепринятые базы данных при электронном ударе облегчают автоматическую идентификацию метаболитов. С другой стороны, методом GC-MS детектируется меньшее количество метаболитов в сравнении с методом LC-MS. Это, главным образом, обусловлено процессом дериватизации, необходимым для GC-MS анализа, и ограничением по молекулярному весу метаболитов, анализируемых данным методом. Поэтому большее количество метаболитов, традиционно, детектируется методом LC-MS. Недостатком является то, что метод ионизации электроспреем, применяемый при LC-MS, более чувствителен к интерференции матричных ионов, в частности, к формированию аддуктов и их супрессии [160]. Однако тщательного рассмотрения требует не только выбор аналитического оборудования, но и весь метаболомный эксперимент должен планироваться как единое целое.

Омиксные исследования позволяют получать информацию о физиологических процессах, происходящих на разных уровнях [152, 154, 161]. Учитывая весьма разнообразные особенности информации, получаемой с каждой омиксной платформы, можно ожидать, что комбинация различных омиксных подходов предоставит полное представление об особенностях секреции раковых клеток. Изучение биологических жидкостей пациентов, таких как опухолевые асциты, с использованием омиксных

технологий помогло бы не только помочь в понимании особенностей жизнедеятельности раковых клеток в организме, но и оказаться полезным для разработки новых методов лечения. Однако, до сих пор, в подавляющем большинстве случаев, протеомные исследования асцитов при раке яичника были исключительно направлены на поиск потенциальных биомаркеров этого заболевания [46-48, 139]. Метаболомные исследования, насколько нам известно, были проведены для анализа мочи и сыворотки крови пациентов [155-157], но метаболиты асцитов при раке яичника не были изучены вовсе.

Заключение

Совершенно очевидно, что для существования многоклеточных организмов необходима тесная коммуникация клеток друг с другом. Для обеспечения этого процесса тратится значительное количество энергии и существует большое разнообразие механизмов передачи информации от клетки к клетке, описанных в данном обзоре. Клетки могут обмениваться любыми типами молекул, начиная от небольших липидов и малых некодирующих РНК и заканчивая крупными белками, мРНК и даже фрагментами геномной ДНК. Однако, зачастую оказывается, что процессы, которые являются крайне полезными при нормальной работе организма, начинают нести существенный вред, когда их используют опухолевые клетки. Злокачественные опухоли представляют собой достаточно гетерогенную совокупность клеток, находящихся в постоянном общении друг с другом и со своим микроокружением. Как и любая динамическая система, раковые опухоли эволюционируют и подвергаются изменениям в ответ на внешние воздействия. Часто, такие изменения могут приводить к появлению или пролиферации более агрессивных и устойчивых к терапии клеток. Более того, показано, что клетки, подвергающиеся апоптозу под действием терапии, секретируют молекулы, ускоряющие пролиферацию соседних, выживших опухолевых клеток. По этой причине, мониторинг изменения микроокружения раковых клеток под действием химио- и радиотерапии может быть полезен для обнаружения прогностических маркеров успешности лечения, а также для выявления новых лекарственных мишеней.

ГЛАВА II. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

1 Оборудование и материалы

В работе использовали следующее оборудование:

Центрифуги с охлаждением Eppendorf (5804R и 5418R); спектрофотометр для микропланшетов iMark (Bio-Rad); многоканальный спектрофотометр Apollo 8 LB 912 (Berthold Technologies); камеры для электрофореза в полиакриламидном геле PROTEAN II xi Cell и Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad); термостат твердотельный Thermostat Plus (Eppendorf); шейкер (Heidolph Unimax 1010); pH-метр (Mettler Toledo); вакуумная установка для твердофазной экстракции (Waters); масс-спектрометр TripleTOF 5600+ (AB Sciex); нано-поточная хроматографическая система NanoLC Ultra 2D+ (Eksigent); ультразвуковая баня (Elma); прибор Nanosight LM10 HS-BF; амплификаторы с детекцией в режиме реального времени CFX96 thermal cycler (Bio-Rad) и Light Cycler96 (Rosche); ПЦР-бокс (Lamsystems); термошейкер для иммунопланшетов (Elmi ST3); ламинарный бокс для работы с эукариотическими клетками класс II (Lamsystems); CO₂-инкубатор (Sanyo); автоматический счётчик клеток Countess (Invitrogen); конфокальный микроскоп Nikon A1; вакуумный концентратор Eppendorf Concentrator 5301; жидкостной хроматограф Милихром А-02 (ЗАО Эконова); центрифуга-вортекс (Bio-San); система для блоттинга Transblot Turbo (BioRad); термостат Гном (ДНК-технологии); флуориметр Qubit (Thermo Fisher); инвертированный флуоресцентный микроскоп Axio Observer 1 (Zeiss AG); проточный цитофлуориметр NovoCyte (ACEA Biosciences); весы лабораторные PRJ и ABS (Kern); холодильники специальные и бытовые, поддерживающие температуру +4 °С, –20 °С, –80 °С; азотное хранилище; система очистки воды MilliQ (Merck).

Оборудование центров коллективного пользования:

1) Хромато-масс-спектрометр Agilent 5975С – Научный парк Санкт-Петербургского государственного университета.

2) Платформа для секвенирования Illumina (NextSeq System), биоанализатор РНК Agilent 2100 bioanalyzer – Междисциплинарный центр коллективного пользования Института фундаментальной медицины и биологии Казанского (Приволжского) федерального университета (г. Казань).

3) ДНК на анализатор ABI3100 «Applied Biosystems» – Центр коллективного пользования «Геномика» СО РАН.

Также использовали:

Комбинаторные гексапептидные лигандные библиотеки (combinatorial hexapeptide ligand libraries (CPLL), “ProteoMiner Protein Enrichment Kit”, Bio-Rad Laboratories); колонки для твердофазной экстракции C18-SD 4mm/1mL Extraction Disk Cartridge (Empore); концентраты центрифужные с отсечкой по 5 кДа, 10 кДа, 30 кДа и 100 кДа (Corning, Agilent Technologies); капиллярная колонка HB5-MS; колонки Chrom XP C18 и 3C18-CL-120 (Eksigent), колонка ProntoSIL-120-5-C18 AQ; набор для выделения РНК SV Total RNA Isolation System (Promega); сорбент Sephadex G25; пластины для ТСХ PEI Cellulose F; рентгеновская пленка (Agfa); предметные стекла восьмилуночных камер Culture Slide (BD Falcon); Набор NextSeq 500/550 High Output Kit v2 (150 cycles) (Illumina); Набор реактивов NEBNext Ultra Directional для создания библиотек РНК для платформы Illumina (New England Biolabs); унабор Ampliclean для очистки ПЦР-продуктов; модуль NEBNext для выделения поли(А)+ мРНК магнитными шариками (New England Biolabs); набор олигонуклеотидов NEBNext Multiplex для платформы Illumina с комплектом праймеров №1 (New England Biolabs); фильтры с размером пор 0,22 мкм (Millipore); автоматические пипетки (Gilson, Eppendorf); наконечники для автоматических пипеток (OmniTip); пластиковые пробирки на 0,2, 0,6, 1,5, 2, 5, 10, 15 и 50 мл (Corning, Eppendorf, Greiner); пробирки для проточного цитофлуориметра; криопробирки (Corning); планшеты для ИФА, планшеты для амплификатора, пластиковые культуральные флаконы и планшеты (Corning, Eppendorf); парафилм (Sigma).

В работе использовали следующие реактивы:

Трипсин (sequencing grade modified trypsin, Promega); йодацетамид, дитиотреитол (DTT), HEPES (4-(2-оксиэтил)1-пиперазинэтансульфоновая кислота), муравьиная кислота и трифторуксусная кислота (Sigma-Aldrich); глицин и Tris-HCl (трис-(гидроксиметил)-аминомета), гуанидин-гидрохлорид (Panreac), ацетат аммония и бикарбонат аммония (Fluka). Ацетонитрил качества для LC-MS (LiChrosolv), ацетон для хроматографии (LiChrosolv), метанол для хроматографии (LiChrosolv), этанол для хроматографии (LiChrosolv) и вода для хроматографии (Merck); персульфат аммония, ЭДТА, NaCl, Тритон X-100, глицерин («Хеликон»), TEMED, мочевины, тиомочевина, акриламид, агароза для электрофореза, MgCl₂ («Fluka»), N,N'-метиленабисакриламид, L-глутамин (ICN), бромфеноловый синий, бромистый этидий (Sigma), дезоксирибонуклеозидтрифосфаты, рибонуклеозидтрифосфаты (Евроген; Jenabioscience), МТТ и среды культуральные DMEM, DMEM F12, RPMI, IMDM, готовые растворы PBS и раствор Хэнкса (Панеко, Sigma), трипсин для клеточных работ (Биолот), гентамицин (Минск, Белоруссия), эмбриональная сыворотка крови крупного рогатого скота (Биолот),

липофектамин 2000, липофектамин RNAiMax, Тризол (Invitrogen, США), РНК-маркер молекулярной массы «RiboRuler Low Range RNA Ladder», ингибитор РНКаз «RiboLock RNase Inhibitor» (Thermo Fisher), Fluorescein isothiocyanate (FITC) (MP Biomedicals); набор для измерения концентрации белка «Quick Start Bradford protein assay» (Bio-Rad Laboratories); обратная транскриптаза MLV reverse transcriptase (Promega); коктейль ингибиторов протеаз (Sigma); 5-этинил уридин, азид Алексы 488 (Thermo Fisher); ингибитор РНКаз «RiboLock RNase Inhibitor», щелочная фосфатаза, ДНКазы I, TRIzol Reagent (Thermo Fisher); Лира и БиоМастер ОТ-ПЦР SYBR Blue (2×) (Биолабмикс); красители Hoechst, DAPI, фаллоидин Alexa Fluor® 594 (Thermo fisher).

Остальные реактивы были отечественного производства квалификации осч или хч. [γ - ^{32}P]АТФ синтезирован в лаборатории биотехнологии Института химической биологии и фундаментальной медицины (ИХБФМ) СО РАН.

Работы по синтезу *in vitro* аналогов мяРНК проводились совместно с лабораторией биотехнологии Института химической биологии и фундаментальной медицины (ИХБФМ) СО РАН.

Олигодезоксирибонуклеотиды, используемые в работе, для ОТ-ПЦР суммарной РНК клеток человека:

- 1) 18S рРНК for: CCA AGA TCC AAC TAC GAG CTT TTT
18S рРНК rev: GAT CCA TTG GAG GGC AAG TCT
- 2) U1 мяРНК for: CAG GGG AGA TAC CAT GAT CAC GAA G
U1 мяРНК rev: CGC AGT CCC CCA CTA CCA CAA AT
- 3) U2 мяРНК for: CCT TTT GGC TAA GAT CAA GTG TAG TAT CTG TT
U2 мяРНК rev: AGC AAG CTC CTA TTC CAT CTC CCT G
- 4) U4 мяРНК for: GCA GTA TCG TAG CCA ATG AGG TCT ATC C
U4 мяРНК rev: TGC AAG TCG TCA CGG CGG G
- 5) U5 мяРНК for: TAC TCT GGT TTC TCT TCA GAT CGC ATA A
U5 мяРНК rev: CTC AAA AAA TTG GGT TAA GAC TCA GA
- 6) U6 мяРНК for: TCG CTT CGG CAG CAC ATA TAC TAA AAT
U6 мяРНК rev: GAA TTT GCG TGT CAT CCT TGC G
- 7) U11 мяРНК for: AAG GCT TCT GTC GTG AGT GGC ACA
U11 мяРНК rev: GGC GCC GGG ACC AAC GA
- 8) U12 мяРНК for: GAC GCC CGA ATC CTC ACT GCT AA
U12 мяРНК rev: CTC CCA GGC ATC CCG CAA AGT A
- 9) U4atac мяРНК for: CCA TCC TTT TCT TGG GGT TGC G
U4atac мяРНК rev: CAA AAG CTC TAG TTG ATG CGG GTG TG

- 10) Uбатас мяРНК for: TGT TGT ATG AAA GGA GAG AAG GTT AGC ACT
Uбатас мяРНК rev: CGA TGG TTA GAT GCC ACG AAG TAG GT
- 11) IFIT3 for: GGC AGA CAG GAA GAC TTC TG
IFIT3 rev: TTT CTG CTT GGT CAG CAT GT
- 12) PKR for: TCG CTG GTA TCA CTC GTC TG
PKR rev: GAT TCT GAA GAC CGC CAG AG
- 13) GAPDH for: GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC
GAPDH rev: GAA GGT GAA GGT CGG AGT
- 14) CD44 for: AGG AGC AGC ACT TCA GGA GGT TAC
CD44 rev: ACT GGG GTG GAA TGT GTC TTG GTC
- 15) ENAH for: TGC TGG CCA GGA GGA GAA GAA T
ENAH rev: ACT GGG CTG TGA TAA GGG TGT GG
- 16) CCND1 (для изоформ CCND1a и CCND1b) for: CCA GAG TGA TCA AGT GTG AC
CCND1a rev: CAA GGA GAA TGA AGC TTT CCC TT
CCND1b rev: GGG ACA TCA CCC TCA CTT AC
- 17) GFP89 for: GAC GTG CAC GGC CAC AAG TT
GFP89 rev: ATG CAG CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG CGG GGG CGA GGA
GCT GTT C
- 18) ZEB1 for: AAC TGC TGG GAG GAT GAC AC
ZEB1 rev: TCC TGC TTC ATC TGC CTG A
- 19) ZEB2 for: CGA TCC AGA CCG CAA TTA AC
ZEB2 rev: TGC TGA CTG CAT GAC CAT C
- 20) TWIST1 for: GGC ATC ACT ATG GAC TTT CTC TAT T
TWIST1 rev: GGC CAG TTT GAT CCC AGT ATT
- 21) SLUG for: TGG TTG CTT CAA GGA CAC AT
SLUG rev: GCA AAT GCT CTG TTG CAG TG
- 22) OVOL1 for: ACG ATG CCC ATC CAC TAC CTG
OVOL1 rev: TTT CTG AGG TGC TGG TCA TCA TTC
- 23) IFIT1 for: AAA AGC CCA CAT TTG AGG TG
IFIT1 rev: GAA ATT CCT GAA ACC GAC CA

Олигодезоксирибонуклеотиды, используемые для синтеза ДНК-матриц аналогов мяРНК:

- 1) T7_U12 for: ATG CAG CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG TGC CTT AAA CTT
ATG AG
U12 rev: CGG GCA GAT CGC AAC TCC CAG GCA TCC CGC AAA G

2) T7_U6atac for: ATG CAG CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG GTG TTG TAT GAA
AGG AGA G

U6atac rev: AAA AAC GAT GGT TAG ATG CCA CGA AGT AGG

3) T7_GFP89 for: ATG CAG CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG ACG TGC ACG
GCC ACA AGT T

GFP rev: GGT GGT GCA GAT GAA CTT GA

2 Пациенты и биологические образцы

На первом этапе работы для анализа было взято 10 образцов асцитов от пациенток с диагнозом серозная аденокарцинома яичника (далее, опухолевые асциты), сбору асцитов предшествовало несколько курсов неoadъювантной химиотерапии. Образцы были получены из Российского научного центра рентгенорадиологии (Москва, Россия), из научно-исследовательского отдела раннего канцерогенеза, профилактики, диагностики и комплексного лечения онкологических заболеваний женских репродуктивных органов (Таблица 1). Так же на первом этапе работы в качестве неракового контроля были получены образцы асцитов от пяти пациенток с портальным алкогольным циррозом (средний возраст 53 года) (далее, асциты от пациенток с циррозом). Образцы предоставил Центр гастроэнтерологии (Москва, Россия). Характеристика биологического материала представлена в таблице 1. Данные асциты использовались для следующих экспериментов: метаболомный анализ, протеомный анализ, подсчет экзосом с помощью метода анализа треков наночастиц (Nanoparticle tracking analysis, NTA), иммуноблотинг и выделение РНК с последующей ОТ-ПЦР интересующих молекул.

На втором этапе работы была собрана коллекция биологического материала, которая включает парные образцы асцитов от пациенток с аденокарциномой яичника до лечения и от тех же пациенток после курсов неoadъювантной химиотерапии (Таблица 2). Таким образом, забор асцитов осуществлялся двукратно: до начала неoadъювантной химиотерапии путем лапароцентеза и интраоперационно (не ранее чем через 21 день после очередного курса неoadъювантной химиотерапии). Данная коллекция клинических образцов тщательно охарактеризована: для каждого конкретного случая имеются гистологические и цитологические заключения, информация о количестве проведенных курсов неoadъювантной химиотерапии, сведения о наличии мутаций в генах BRCA1/2, а также о концентрациях онкомаркера CA125 во время лечения. Кроме того, имеются сведения о текущем состоянии пациентки, о возникновении рецидива или продолженного роста (Таблица 2). Вторая часть образцов использовалась для протеомного анализа, для

получения первичных культур клеток, для МТТ теста с целью изучения протективного эффекта асцитов, а также для выделения РНК с последующей ОТ-ПЦР интересующих генов.

Все диагнозы были подтверждены морфологическими заключениями. Исследование было проведено с письменного согласия пациенток.

Таблица 1 – Образцы асцитов, использованных на первом этапе работы

№	Возраст пациентки, лет	Диагноз	Стадия	Количество проведенных курсов химиотерапии до забора асцитов	Онкомаркер СА 125 (Е/мл)	Онкомаркер НЕ 4 (пикоМ/л)
1	55	Серозная аденокарцинома яичника	III	2	> 500	4012
2	58	Серозная аденокарцинома яичника	III	2	> 500	3503
3	60	Серозная аденокарцинома яичника	III	1	> 500	2840
4	57	Серозная аденокарцинома яичника	II	2	162	2454
5	55	Серозная аденокарцинома яичника	III	1	> 500	4064
6	59	Серозная аденокарцинома яичника	III	1	> 500	2810
7	54	Серозная аденокарцинома яичника	II	2	> 500	7802
8	57	Серозная аденокарцинома яичника	II	1	166	401
9	53	Серозная аденокарцинома яичника	III	3	404	2280
10	58	Серозная аденокарцинома яичника	III	1	> 500	1040
11	54	Портальный алкогольный цирроз	-	-	> 500	802,3
12	58	Портальный алкогольный цирроз	-	-	212	622,6
13	57	Портальный алкогольный цирроз	-	-	215	632,3
14	53	Портальный алкогольный цирроз	-	-	215	645,2
15	64	Портальный алкогольный цирроз	-	-	> 500	441,7

Таблица 2 – Опухолевые асциты, полученные от пациенток до лечения и от тех же пациенток после курса неoadьювантной химиотерапии.

№ Пациентки	Диагноз	Стадия	Возраст, лет	Количество курсов химиотерапии (карбоплатин + таксаны)	Через 6 месяцев после лечения
1	Серозная аденокарцинома яичника (первичная опухоль)	III	44	2	Рецидив опухоли
2	Серозная аденокарцинома яичника (первичная опухоль)	III	76	4	Рецидив опухоли
3	Серозная аденокарцинома яичника (первичная опухоль)	III	50	4	Рецидив опухоли

3 Получение асцитных жидкостей

Взятие всех асцитных жидкостей производилось с использованием стерильных флаконов объемом 50 мл (Falcon). Сразу после забора асцитные жидкости центрифугировали при 1500 g (3000 rpm) в течение 15 мин. (при комнатной температуре) с целью удаления клеток. Образцы хранились при -70°C. Транспортировку образцов производили в термосе с жидким азотом. Перед протеомным анализом образцы центрифугировались при 16000 g в течение 15 мин. для удаления клеточного дебриса.

На первом этапе работы протеомный анализ асцитов проводился в трех повторах с использованием пула из 10 асцитов от пациенток с аденокарциномой яичника после химиотерапии и пула из 5 асцитов от пациенток с портальным алкогольным циррозом (Рисунок 3). Метаболомный анализ был проведен для 7 индивидуальных опухолевых асцитов и 4 индивидуальных асцитов от пациенток с циррозом в трех технических повторах. NTA и выделение РНК для последующего анализа методом ПЦР в реальном времени проводились на индивидуальных образцах.

На втором этапе работы протеомный анализ проводился на индивидуальных образцах асцитов от одних и тех же пациенток с аденокарциномой яичника до и после химиотерапии, в двух технических повторах каждый.

4 Измерение концентрации белка

Концентрация белка для каждого образца или пула образцов была определена с помощью метода Брэдфорд с использованием набора “Quick Start Bradford protein assay” (Bio-Rad Laboratories, USA), измерение концентрации проводили по стандартному

протоколу, в качестве калибровочного стандарта использовали бычий сывороточный альбумин (Bio-Rad Laboratories, USA).

5 Пробоподготовка для метаболомного анализа

По 100 мкл асцитных жидкостей (из Таблицы 1) были разаликвочены после чего был добавлен метанол в объеме 300 мкл. Через 15 секунд интенсивного перемешивания на вортексе, высаженные белки были отделены от супернатанта при помощи центрифугирования при 16000 g в течение 15 мин при комнатной температуре. Затем аликвоты по 90 мкл были перемещены в новые пробирки и каждый образец был лиофильно высушен в течение 18 ч. Лиофилизированные образцы были растворены в 20 мкл пиридина и переведены в производные триметилсилила после добавления N,O-бис-(триметилсилил)трифторацетамида, содержащего 1% триметилхлорсилана. Химическая реакция была индуцирована инкубированием при 100°C в течение 15 мин, далее по 0,5 мкл этой реакционной смеси было инжесктировано в газовый хроматограф.

6 Масс-спектрометрия, совмещенная с газовой хроматографией

Силилированные образцы были проанализированы на газовом хроматографе HP 6850, совмещенном с масс-спектрометром HP 5975C. Капиллярная колонка HB5-MS была использована с гелием, в качестве газа-носителя, при постоянной скорости потока 1 мл/мин. Температура инжектора и МС источника поддерживалась постоянной и составляла 320°C и 230°C, соответственно.

Температура колонки на момент ввода образца составляла 70°C, а затем повышалась на 6°C/мин до 320°C с последующим удержанием этой температуры в течение 15 мин. Трикозан (10 мкг) был использован как внутренний стандарт для количественного анализа. Образцы были проанализированы в режиме разделения (соотношение 1/20). Ионизация электронным ударом проводилась при энергии ионизации 70 эВ. Диапазон анализируемых масс от 50 до 1000 Да, скорость 1,27 спектра в секунду. Обработка данных и их количественный анализ были проведены с помощью программы AMDIS. Компоненты были идентифицированы сравнением масс-спектров и хроматографических характеристик удержания с масс-спектрами известных искусственных стандартов из базы NIST (National Institute of Standards and Technology 2010). Сумма экстрагированных ионных токов, ассоциированных с компонентом хроматограммы, была использована для количественного анализа. Масс-спектрометрия,

совмещенная с газовой хроматографией, была проведена на базе Научного парка Санкт-Петербургского государственного университета.

7 Обработка комбинаторными гексапептидными лигандными библиотеками

Подготовка реагентов, колонок, нанесение и промывка образцов асцитов осуществлялись в соответствии с протоколом производителя (ProteoMiner Protein Enrichment Kit, Bio-Rad).

Элюцию проводили по модифицированному протоколу четырьмя различными буферными растворами (в двух повторах для каждого раствора): (1) 1 М NaCl, 20 мМ HEPES (4-(2-оксиэтил)1-пиперазинэтансульфоновая кислота), pH=7,5; (2) 200 мМ глицин-HCl, pH=2,4; (3) 60% этиленгликоль; (4) 13,3% изопропиловый спирт, 7% ацетонитрил, 0,1% трифторуксусная кислота. Кислая белковая фракция была нейтрализована добавлением 3 М Tris-HCl сразу же после элюции.

Все фракции для каждого образца были объединены и нанесены на картриджи для ультрафильтрации с отсечкой по молекулярной массе 5кДа для замены буфера на 10 мМ TRIS-HCl (pH=8). Далее после повторного измерения концентрации отбирали по 250 мкг белка и образец помещали в новую пробирку.

Далее проводилось фракционирование с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях (SDS-PAGE) с последующим трипсинолизом в геле.

8 Электрофорез в полиакриламидном геле

Образцы асцитов после обработки CPLL были разделены с помощью 9% полиакриламидного геля (20 x 20 см). Электрофорез останавливали, когда фронт красителя опускался ниже концентрирующего геля на 5 см. Далее гель был разделен на 12 фрагментов для проведения трипсинолиза в геле.

9 Трипсинолиз в геле

Фрагменты геля были нарезаны на более мелкие части (примерно 2 x 2 мм) и помещены в пробирки. Для разрушения дисульфидных связей образцы геля инкубировали в буфере, содержащем 10 мМ ДТТ, 100 мМ бикарбоната аммония, при температуре 50°C в течение 30 минут. Затем для алкилирования цистеинов был использован буфер,

содержащий 55 мМ йодацетамида и 100 мМ бикарбоната аммония при комнатной температуре в течение 20 минут в темноте. После реакции алкилирования образцы геля были обесцвечены в буфере, состоящим из 50% ацетонитрила, 50 мМ бикарбоната аммония и дегидратированы с помощью 100% ацетонитрила. После удаления 100% ацетонитрила образцы были подвергнуты трипсинолизу в геле с добавлением буфера, содержащего 13 нг/мкл трипсина, 50 мМ бикарбоната аммония, 5% ацетонитрила. Трипсинолиз проводили в течение 14 часов при температуре 37°C. Полученные пептиды экстрагировали из геля добавлением двух объемов 0,5% трифторуксусной кислоты и инкубировали в течение часа, затем добавляли два объема 50% ацетонитрила и инкубировали в течение часа. После чего пептиды концентрировали в вакуумной центрифуге и повторно растворяли в 3% ацетонитриле с 0,1% раствором трифторуксусной кислоты перед LC-MS/MS анализом.

10 LC-MS/MS анализ

Анализ проводили на масс-спектрометре TripleTOF 5600+, оснащенном источником ионов NanoSpray III (ABSciex, Canada) и совмещенном с нано-поточной хроматографической системой NanoLC Ultra 2D+ (Eksigent). ВЭЖХ система использовалась в конфигурации предколонка – разделяющая колонка. В качестве буфера для нанесения образца и буфера А использовался следующий буфер: 98,9% воды, 1% метанола, 0,1% муравьиной кислоты (об./об.). Буфер В представлял собой смесь 99,9% ацетонитрила и 0,1% муравьиной кислоты (об./об.).

Образцы наносили на предколонку Chrom XP C18 (3 мкм 120 Å 350 мкм*0,5 мм; Eksigent, Dublin, CA) при скорости потока 3 мкл/мин в течение 10 мин. Разделение осуществляли на колонке 3C18-CL-120 (3 мкм, 120 Å, 75 мкм*150 мм; Eksigent, Dublin, CA) при скорости потока 300 нл/мин в линейном повышающемся градиенте буфера В (от 5% до 40% в течение 90 мин). Колонку и предколонку регенерировали после каждого анализа промывкой 95% буфера В в течение 10 мин и уравнивали 5% буфера В в течение 20 мин.

Для идентификации пептидов использовался данные-зависимый режим работы масс-спектрометра (IDA). Каждый цикл включал 1 обзорный MS1 спектр с последующими 50 зависимыми MS2 спектрами. Для MS1 анализа использовались следующие параметры работы прибора: диапазон масс для анализа и последующего отбора ионов для фрагментационного анализа 300-1250 m/z, время накопления сигнала 250 мсек. Ионы для MS2 анализа выбирались на основании интенсивности ионного тока с

пороговым значением 200 импульсов в секунду и зарядом от +2 до +5. Для MS2 анализа использовались следующие параметры: разрешение квадрупольного UNIT (0,7 Да), диапазон масс 200-1800 m/z, оптимизация фокусировки ионного пучка – для получения максимальной чувствительности (разрешение ~20000), время накопления сигнала 50 мсек для каждого иона. Для столкновительной диссоциации использовался азот. Энергия столкновений была одинаковой для всех ионов и линейно изменялась от 25 до 55 В в течение 50 мсек времени накопления сигнала. Ионы, для которых получали MS2 спектр, вносились в динамический лист исключения на 15 сек с целью повышения вероятности получения MS2 спектра в высшей точке хроматографического пика пептида (средняя ширина пика для компонентов составляла 30 сек).

Раствор триптического гидролизата β -галактозидазы (20 фемтомоль) был использован с 15-мин градиентом (5% до 25% буфера В) для калибровки масс-спектрометра и контроля производительности, стабильности и воспроизводимости системы.

11 Анализ LC-MS/MS данных

Данные были конвертированы в .mgf файл с помощью программы ProteinPilot (version 4.5). Для этой процедуры ProteinPilot был запущен в режиме идентификации со следующими параметрами: алкилирование цистеинов йодацетамидом, гидролиз трипсином, прибор TripleTOF 5600 и поиск белков, детектируемых с порогом 95,0%, по базе данных SwissProt, таксон Homo Sapiens (версия 2016 года, со 176397 элементами). Для более тщательной идентификации белков был сгенерирован список пиков, который был проанализирован программами MASCOT (версия 2.5.1) и X! Tandem (CYCLONE, 2013.2.01) с использованием базы данных UniProtKB, таксон Homo Sapiens. Проверка статистической достоверности идентификаций осуществлялась на основании поиска по реверсированной базе данных белковых последовательностей (decoy reversed database).

Допустимые отклонения от массы иона предшественника и фрагмента были 20 ppm и 0,04 Да, соответственно. Параметры поиска по базе данных были следующие: допущение одного пропущенного сайта специфического расщепления трипсином, фиксированная модификация – карбамидометилирование (C), и динамическая модификация – окисление (M). Для программы X! Tandem были также выбраны параметры, позволяющие осуществлять быструю проверку ацетилирования N-концевых остатков белков, потери молекулы аммиака N-концевых глутаминов пептидов, или потери молекулы воды N-концевой глутаминовой кислоты пептидов. Результирующие файлы были

загружены в программу Scaffold 4 (версия 4.2.1) для валидации и мета-анализа. В качестве достоверно идентифицированных пептидов и белков рассматривались компоненты, попадающие по уровню достоверности в массив идентификаций с Local FDR 5%.

Количественный анализ белков проводился на основе подсчета спектров, идентифицированных как пептидные фрагменты соответствующих белков (метод “total spectral count”).

12 Иммуноблоттинг

Равные количества асцитных жидкостей были смешаны 1:1 с буфером для нанесения (100 мМ Tris-HCl (pH 6,8), 20% глицерин, 5% 2-меркаптоэтанол, 4% (масса/объем) SDS, 0,02% (масса/объем) бромфеноловый синий) и разделены с помощью электрофореза в полиакриламидном геле. Белки были перенесены на ПВДФ мембраны с последующим иммуноблотом со специфическими антителами к TGM2 (CUB7402, Abcam), Hsp90 (US Biological), U2AF1 (EPR12649(B), Abcam), U2AF2 (Abcam), HNRNPU (Abcam), HNRNPA2B1 (DP3B3, Abcam) в разведениях, рекомендованных производителями. Меченые белки детектировали с помощью рентгеновской плёнки.

13 Цитокиновое профилирование асцитов

В соответствии с протоколом производителя для образцов асцитов из Таблицы 2 было проведено цитокиновое профилирование с использованием набора Pro Human Cytokine 17-plex Assay (Bio-Rad). В частности, по 50 мкл смеси магнитных микрочастиц вносили в лунки 96 луночного планшета, затем дважды промывали частицы буфером для промывки и вносили по 50 мкл стандарта или образца в соответствующие лунки. Инкубирование проводили при комнатной температуре на орбитальном шейкере (850 об./мин.) в течение 30 мин. Затем планшеты промывали трижды буфером для промывки и в каждую лунку добавляли по 25 мкл биотинилированных антител. Через 30 мин инкубации при комнатной температуре, производили три промывки и вносили по 50 мкл буфера Streptavidin-PE с последующим инкубированием в течение 10 мин. Планшеты были промыты трижды буфером для промывки, после чего микрочастицы ресуспендировали в 125 мкл буфера для анализа. Измерение проводили с помощью прибора Bio-Plex Reader (Bio-Rad). Было проведено определение уровня 17 цитокинов в динамике: IL-1b, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17, G-CSF, GM-CSF, IFN-g, MCP-1 (MCAF), MIP-1b, TNF-a до и после неoadъювантной химиотерапии.

Статистическая обработка полученных результатов была произведена при помощи программного пакета Bio-Plex Data Pro (Bio-Rad).

14 Выделение экзосом из асцитов

Экзосомы были выделены из асцитов с помощью дифференциального центрифугирования по описанному ранее методу [162], с некоторыми модификациями. К 200 мкл каждого образца (Таблица 1) было добавлено по 1,8 мл PBS, затем образцы центрифугировали в течение 30 мин при 10000 g в роторе F-45–24-11 (Eppendorf, Hamburg, Germany) при 4°C. Чтобы получить осадок экзосом, образцы центрифугирования при 100000 g в течение 70 мин в роторе Ti60 (Beckman) при 4°C. Дополнительно экзосомы были очищены центрифугированием в градиенте сахарозы: 48%, 40% и 15% (м/об.) в роторе MLS-50 (Beckman). Осадок после 100000 g был растворен в 600 мкл 48% (м/об.) сахарозы. 500 мкл 40% сахарозы было нанесено на первый слой. Третий слой с низкой плотностью был сформирован 4 мкл 20% сахарозы. После чего образцы центрифугировались при 200000 g в течение 4 ч. при 4°C в роторе MLS-50 (Beckman). Экзосомы во фракции, соответствующей 40% сахарозе, и на границе слоев 40% и 48% сахарозы, были собраны, дважды промыты буфером PBS и сконцентрированы на картриджах Agilent Technologies с фильтром 30 кДа.

Распределение частиц по размеру и определение их концентрации было измерено на приборе Nanosight LM10 HS-BF (Nanosight Ltd, Salisbury, UK) на основе анализа треков частиц. Измерение было произведено с использованием камеры EMCCD Andor Luca и лазера 65-mW при 405 нм. Образцы экзосом были ресуспендированы в буфере PBS (pH=7,4) до концентрации, оптимальной для анализа (www.astm.org). Измерения были проведены в нескольких повторах (от 5 до 12), чтобы получить как минимум 5000 частиц в целом.

15 Выделение РНК из асцитов

Тотальная РНК из асцитов была выделена с использованием набора SV Total RNA Isolation System (Promega, Madison, Wisc) с обработкой ДНКазой по протоколу производителя или с помощью фенол-хлороформной экстракции с использованием реагента Тризол. кДНК была синтезирована с помощью обратной транскриптазы MLV reverse transcriptase (Promega). Количественная ПЦР в реальном времени была проведена в трех повтора на приборе CFX96 thermal cycler (Bio-Rad), или на приборе Light Cycler96

(Rosche) с использованием красителя SYBR green. Данные ПЦР были проанализированы в программах, прилагаемых к приборам. Все уровни РНК были нормализованы на уровни экспрессии 18S или на искусственно синтезированный стандарт – фрагмент GFP (green fluorescent protein), размером 89 нуклеотидов. Специфичность к праймерам была подтверждена визуализацией ДНК на электрофореze в агарозном геле после проведения ПЦР.

16 МТТ-тест

Для проведения МТТ теста клетки (аденокарциномы яичника SKOV3, первичные культуры фибробластов, клеток рака яичника и глиобластомы) в течение 3 дней инкубировались или с опухолевыми асцитами (Таблица 2) в количестве 25% от объема среды, или с кондиционными средами. После чего клетки были рассеяны в 96-луночный планшет и оставлены инкубироваться на ночь. Чтобы выяснить, оказывают ли асциты или кондиционные среды протективный эффект, к раковым клеткам был добавлен цисплатин в дозе IC50. Через 48 ч. после добавления цисплатина клетки обрабатывали реактивом МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид) и инкубировали 4 часа при температуре 37°C для формирования окраски. После чего, МТТ-содержащую среду отбирали и добавляли к клеткам по 100 мкл ДМСО (диметилсульфоксид) для растворения образовавшихся кристаллов формазана. Колориметрические измерения производились с помощью спектрофотометра Bio-Rad iMark Microplate Reader при длине волны 590 нм.

17 Работа с клеточными культурами

17.1 Для протеомных экспериментов

Клетки карциномы яичника человека SKOV3 (5×10^7 клеток) и первичную культуру нормальных дермальных фибробластов культивировали в среде DMEM с 10 mM L-глутамином, с добавлением 100 ед/мл пенициллина, 100 мг/мл стрептомицина сульфата в присутствии 10% эмбриональной сыворотки крови крупного рогатого скота (FBS) при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в культуральных флаконах. При достижении конfluence примерно 80%, часть клеток SKOV3 и фибробластов обрабатывали цисплатином в течение 7 часов до конечной концентрации его в среде 40 микроМ и 80 микроМ, соответственно (время инкубации и количество цисплатина соответствуют дозе IC50).

Другую часть клеток оставляли интактной и использовали в качестве контроля. Через 7 часов с момента добавления цисплатина во всех культуральных флаконах среду, содержащую FBS, удаляли и клетки промывали 4 раза бессывороточной средой, и затем клетки инкубировали в бессывороточной безиндикаторной среде DMEM не более 17 часов. Первичная культура клеток глиобластомы велась на бессывороточной среде DMEM F12. При достижении конfluence примерно 80% клетки часть подвергали ионизирующему излучению 12 Гр, а часть клеток оставляли интактной. Через сутки отбирали кондиционные среды.

В среднем, в 100 мл кондиционной среды содержалось 355 мкг белка.

17.2 Для экспериментов с мяРНК

Для анализа влияния аналогов мяРНК на опухолевые клетки использовали клетки аденокарциномы молочной железы MCF7 и клетки карциномы яичника SKOV3.

Клетки аденокарциномы молочной железы человека MCF-7 культивировали в среде IMDM с 10 mM L-глутамином и 40 мкг/мл гентамицина в присутствии 10% эмбриональной сыворотки крови крупного рогатого скота при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в культуральных флаконах с площадью поверхности дна 25 см².

Клетки карциномы яичника SKOV3 культивировали в среде DMEM с 10 mM L-глутамином, с добавлением 100 ед./мл пенициллина, 100 мг/мл стрептомицина сульфата в присутствии 10% эмбриональной сыворотки крови крупного рогатого скота при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в культуральных флаконах с площадью поверхности дна 25 см².

18 Протеомный анализ секретомов клеток

Кондиционные среды (секретомы) были отобраны от клеток SKOV3, первичных культур клеток глиобластомы и фибробластов (см. пункт 16.1), к каждому образцу был добавлен коктейль ингибиторов протеаз, далее их центрифугировали при 1500 g в течение 10 мин., чтобы удалить открепившиеся клетки, после чего культуральные среды были немедленно заморожены в жидком азоте и лиофилизованы для сокращения объема среды. Лиофилизат ресуспендировали в течение 30 минут в буфере, содержащем 6M Gd-HCl, 10 mM TRIS-HCl (pH=8), 2 mM DTT. Чтобы отделить нерастворимую фракцию, раствор центрифугировали при 16000 g 10 мин (4°C). Далее все супернатанты наносили на картриджи для ультрафильтрации (Spin-X UF6, Sigma) с отсечкой по молекулярной массе

5 кДа для замены буфера на 10 мМ TRIS-HCl (pH=8). Концентрацию белка измеряли методом Брэдфорд и проводили трипсинолиз в растворе.

19 Трипсинолиз в растворе

Образцы солибилизировали в денатурирующем буфере (8 М мочевины, 2 М тиомочевины, 10 мМ Tris-HCl, pH 7.5) (в соотношении 3:1) и инкубировали в течение 20 минут при 24°C. Далее для восстановления дисульфидных связей белков образцы инкубировали в растворе 5 мМ DTT при 24°C в течение 30 мин и затем проводили алкилирование, инкубируя образцы в растворе 10 мМ йодацетамида при комнатной температуре в течение 20 мин в темноте. Алкилированные образцы были разбавлены раствором 50 мМ бикарбоната аммония в соотношении 1:4; далее к образцам добавляли раствор трипсина (0,01 мкг трипсина на 1 мкг белка), и инкубировали их при 37°C в течение 12 ч. После проведения гидролиза реакцию останавливали добавлением муравьиной кислоты до финальной концентрации ее в растворе 5%. Далее полученные триптические пептиды были обессолены с использованием микроколонок Discovery DSC-18 (1-мл пробирки, с допустимой нагрузкой 50 мг), высушены в вакуумном испарителе, и хранились при -80°C до LC-MS/MS анализа.

20 Проточная цитофлуориметрия

Три первичные культуры клеток, выделенные из асцитов до лечения (Таблица 2), культивировали в 6-луночной планшете с асцитами (25% от общего объема среды в лунке) до и после лечения от соответствующих пациенток в течение 3 дней. Опухолевые клетки были фиксированы 4% параформальдегидом, блокированы 10% FBS и инкубированы с первичными антителами против CD324 (E-cadherin; 1336505, Sony) или CD325 (N-cadherin; 2354010, Sony) в течение 1 часа, с дальнейшей инкубацией со вторичными антителами, конъюгированными с Alexa Fluor 488. После окрашивания образцы были проанализированы на приборе NovoCyte Flow Cytometer (ACEA Biosciences), данные были обработаны с помощью программы FlowJo 10.

Для оценки клеточного цикла клетки SKOV3 через 3 дня после трансфекции мРНК фиксировали раствором 70% этанола в течение 1 часа и промывали PBS. Затем клетки ресуспендировали в 0,5 мл раствора DAPI и инкубировали 30 минут во льду. После окрашивания образцы были проанализированы на приборе NovoCyte Flow Cytometer (ACEA Biosciences), данные были обработаны с помощью программы FlowJo 10.

21 Фракционирование клеток

Цитоплазматическая и ядерная фракции были выделены из клеток SKOV3 по ранее описанной методике [163] с небольшими модификациями. Клетки промывали три раза буфером PBS, ресуспендировали в 5 мл буфера А, содержащего 10 mM HEPES (pH=7,9), 1,5 mM MgCl₂, 10 mM NaCl, 0,5 mM DTT и коктейль ингибиторов протеаз. После чего часть клеток лизировали в буфере Лэммли для получения тотального лизата. В другую часть клеток добавляли Твин100 до конечной концентрации его в растворе 0,5% и 0,25M сахарозы и инкубировали в течение 10 мин на льду. В это время нарушалась целостность цитоплазматической мембраны, высвобождение ядер контролировалось под микроскопом. После чего раствор центрифугировали при 228 g в течение 5 мин при 4°C. Супернатант представлял цитоплазматическую фракцию, для денатурации белков к нему добавляли буфер Лэммли. Осадок ядер ресуспендировали в 500 мкл и дважды промывали в буфере А. Чистый осадок ядер ресуспендировали в буфере Лэммли.

Образцы тотальных лизатов и ядерных фракций клеток разрушали ультразвуком 3 × 10 сек. Концентрация белка была измерена методом Брэдфорд. Затем равные количества белка из каждой фракции (по 250 мкг): тотального лизата, ядерной и цитоплазматической – были разделены электрофорезом в 9% ПААГ, гидролизованы трипсином, как описано в пункте 8 и проанализированы масс-спектрометрически (см. пункты 9, 10 и 11).

22 Мечение молекул РНК в клетках-донорах и их детекция в клетках-реципиентах

Для мечения молекул РНК, синтезируемых в клетках-донорах, в культуральную среду к 15 миллионам клеток глиобластомы добавляли 1 mM 5-этинил уридина (Thermo Fisher Scientific). Через 24 часа клетки были облучены дозой ионизирующего излучения 12 Gr. Через 48 часов из культуральной среды выделили везикулы, секретированные клетками, методом ультрацентрифугирования. Для этого среда была центрифугирована 20 минут при 1000 g, после чего супернатант был отобран и центрифугирован 80 минут при 120000 g при +4°C. Осадок был ресуспендирован в 35 мл PBS и повторно центрифугирован при тех же условиях, чтобы избавиться от не включившегося в РНК 5-этинил уридина. После центрифугирования осадок везикул ресуспендировали в 1 мл культуральной среды и добавляли эту среду к не меченым клеткам. Через 12 часов инкубации с везикулами клетки фиксировали и окрашивали азидом Алексы 488 (Thermo Fisher Scientific) как описано ранее [164]. Далее клетки были окрашены первичными

антителами против белка SF3A3 (ab156873) и вторичными антителами, конъюгированными с Алексой 647 по стандартной методике. Для окрашивания цитоплазматической мембраны использовали антитела против CD44 (Cell Signaling 3570), конъюгированными с Алексой 555. После окрашивания клетки анализировали на конфокальном микроскопе Nikon A1.

23 Конструирование и синтез аналогов мяРНК

Для конструирования мяРНК использовали последовательности известных малых ядерных РНК человека: U12 и U6atac.

Синтез ДНК-матриц проводили с использованием наборов олигодезоксирибонуклеотидов. Амплификацию ДНК-матрицы проводили в реакционной смеси «БиоМастер HS-Тaq ПЦР» («Биолабмикс», Новосибирск), в следующих условиях: 94°C – 3 мин, 28 циклов: 94°C – 10 с, 57°C – 10 с, 72°C – 10 с. Продукты амплификации анализировали электрофорезом в 2,5% агарозном геле по стандартной методике.

Транскрипцию *in vitro* проводили в 100 мкл реакционной смеси, содержащей 6 мМ MgCl₂, 40 мМ Трис-НСl, рН 7,9 (при 25°C), 10 мМ ДТТ, 10 мМ NaCl, 2 мМ спермидин гидрохлорид, 60 е.а. РНК-полимеразы фага Т7. Глубину модификации варьировали изменением исходных соотношений m6АТР/АТР, m5СТР/СТР, ΨТР/УТР. Синтез проводили при 37°C 2–18 ч. Продукты транскрипции сразу после реакции синтеза анализировали в 2,5% агарозном геле и 10% денатурирующем (7 М мочевины) полиакриламидном геле (ПААГ). Для нанесения проб РНК в гель использовали краситель для нанесения с формамидом; в качестве маркера молекулярной массы использовали «RiboRuler Low Range RNA Ladder».

По завершении транскрипции продукты транскрипции осаждали из реакционной смеси этанолом. Для этого к реакционной смеси добавляли этанол до 75%, выдерживали полученную смесь в течение 10 мин при -20°C и центрифугировали при 16000g 10 мин. Супернатант удаляли, осадки промывали 75% этанолом. Полученные осадки высушивали на воздухе или в вакуумном концентраторе Eppendorf Concentrator 5301 и растворяли в деионизованной воде. Растворы РНК хранили при -70°C.

Очистку продуктов транскрипции от низкомолекулярных компонентов реакционной смеси (в первую очередь от не включившихся нуклеозидтрифосфатов) проводили с использованием гель-фильтрации на сорбенте Sephadex G25 (V=1000 мкл на 100 мкл реакционной смеси). Затем проводили гидролиз ДНК-матриц с помощью ДНКазы I, при одновременной обработке синтетических РНК щелочной фосфатазой. Для этого к

полученным элюатам после гель-фильтрации добавляли ДНКазу I в расчете 5 е.а. на 1 мкг ДНК-матрицы и щелочную фосфатазу в расчете 10 е.а. на 1 мкг РНК. Полученную реакционную смесь инкубировали при 37°C 20 мин в буфере, содержащем 2,5 мМ MgCl₂, 10 мМ Трис-НСl, рН 7,5 (при 25°C), 0,1 мМ СаCl₂. Для повышения стабильности РНК к реакционной смеси добавляли ингибитор РНКаз «RiboLock RNase Inhibitor» в соответствии с протоколом производителя. РНК из реакционной смеси выделяли методом фенол-хлороформной экстракции с применением реагента «Лира» («Биолабмикс», Новосибирск) по протоколу производителя, описанному в п. 27 (Выделение суммарной РНК клеток человека). Затем очищенные транскрипты обрабатывали полинуклеотид киназой Т4 (ПНК Т4) в смеси с 0,1 мМ АТР, 10 мМ ДТТ в буфере, содержащем 2,5 мМ MgCl₂, 10 мМ Трис-НСl, рН 7,5 (при 25°C), 0,1 мМ СаCl₂. ПНК Т4 добавляли в реакцию из расчета 20 е.а на реакцию. Инкубировали 30 минут при 37°C. Для очистки транскриптов от АТР, фермента и других компонентов реакционной смеси проводили препаративную офВЭЖХ на приборе Милихром А-02 (ЗАО Эконова, Россия), оснащенный колонкой ProntoSIL-120-5-C18 AQ и многоволновым спектрофотометром. Для элюции использовали линейный градиент в системе растворителей: раствор А – 0,05 М водный раствор тетраэтиламмоний ацетата (рН=7,5); раствор Б – 0,05 М раствор тетраэтиламмоний ацетата в 20% растворе ацетонитрила (рН=7,5). Обработку результатов хроматографии проводили с помощью программного пакета МультиХром версии 1.5х-Е. Осаждение РНК из хроматографических фракций проводили этанолом в присутствии 0,6 М ацетата натрия. Концентрацию синтетических РНК определяли спектрофотометрически, измеряя поглощение раствора РНК на длине волны 260 нм с учетом коэффициента экстинкции $\epsilon_{260}=0,025 \text{ (мкг/мл)}^{-1} \times \text{см}^{-1}$. Для подтверждения первичной структуры ДНК-матриц для синтеза аналогов малых ядерных РНК проводили секвенирование по методу Сэнгера с использованием флуоресцентно меченых терминаторов ДНК-полимеразы в составе смеси «BigDye 3.1» («Applied Biosystems»), с последующим разделением ДНК на анализаторе – ABI3100 «Applied Biosystems» (ЦКП «Геномика» СО РАН).

24 Получение FITC-меченных мРНК

Для получения FITC-меченных аналогов на этапе транскрипции смесь нуклеозидтрифосфатов содержала 25% 5-аминоалилуридин-5'-трифосфата (AA-УТР)/ 75% УТР. Встраивающийся мономер AA-U содержит в структуре амиолинкер, к которому после синтеза и очистки аналога присоединяется активированный FITC.

25 Введение [³²P]-метки по 5'-концу мяРНК

Введение [³²P]-метки по 5'-концевой гидроксильной группе нуклеиновых кислот проводили в реакционной смеси, содержащей 10 мМ MgCl₂, 50 мМ Трис-НСl, рН=8,8 (при 25°C), 10 мМ ДТТ, 30 е.а. полинуклеотидкиназы и 10 МБк [γ -³²P]АТР. Реакционную смесь инкубировали при 37°C 40 мин. Выход [³²P]-меченого продукта контролировали методом ТСХ на пластинах PEI Cellulose F в системе 1 М NaH₂PO₄, рН=7,5 (при 25°C) с последующей автордиографией. Для фосфорилирования 5'-концов продуктов транскрипции *in vitro* предварительно проводили дефосфорилирование РНК в буфере, содержащем 10 мМ Трис-НСl, рН=8,0 (при 25°C), 5 мМ MgCl₂, 0,1 М KCl, 0,02% Тритон X-100 и щелочную фосфатазу из расчета 0,5 е.а на 1 мкг РНК. Реакционную смесь инкубировали при 37°C 60 мин, затем проводили инактивацию фосфатазы. Для очистки [³²P]-меченых РНК проводили разделение продуктов реакции кинирования в 10% денатурирующем ПААГ с последующей элюцией РНК в раствор 0,3 М ацетата натрия. Радиоактивно меченые РНК осаждали этанолом, растворяли в деионизованной воде и хранили при -70°C.

26 Трансфекция клеток MCF-7 и SKOV3 аналогами мяРНК

Для изучения влияния аналогов мяРНК на клетки человека клетки MCF-7 и SKOV3 рассаживали в культуральные планшеты до плотности 2×10^4 клеток/см² и затем инкубировали при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в течение 24 ч. Синтезированные аналоги малых ядерных РНК инкубировали с раствором липофектамина (RNAiMax или Lipofectamin 2000) в течение 20 мин и добавляли к клеткам до конечной концентрации 10-80 нМ в зависимости от эксперимента. Затем клетки инкубировали при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в течение 24-48 часов в зависимости от эксперимента.

27 Выделение суммарной РНК клеток человека

По завершении инкубации клеток после трансфекции среду удаляли, к клеткам добавляли реагент для лизиса Тризол (Invitrogen) или аналогичный «Лира» («Биолабмикс», Новосибирск), и инкубировали в течение 5 мин при комнатной температуре. Лизат собирали, добавляли хлороформ в расчете 1:5 по отношению к объему Тризола, полученную смесь интенсивно встряхивали и центрифугировали 10 мин при 12000g и 4°C. Водную фазу собирали, добавляли к ней равный объем изопропилового

спирта, смесь выдерживали 15 мин при -20°C , и затем проводили центрифугирование в течение 10 мин при $16000g$ и 4°C . Супернатант удаляли и промывали осадки 80% этиловым спиртом. Полученные осадки клеточной РНК высушивали и растворяли в деионизованной воде, растворы хранили при -70°C . Концентрацию нуклеиновых кислот в препаратах определяли спектрофотометрически.

28 Анализ накопления флуоресцентно-меченой РНК в клетках человека

Анализ накопления в клетках SKOV3 FITC-меченных аналогов проводили с использованием методов флуоресцентной микроскопии на приборе Axio Observer 1 («Zeiss AG», Германия). Клетки SKOV3 высаживали либо на предметное стекло восьмилуночной камеры Culture Slide («BD Falcon») (3×10^4 клеток/лунку) для анализа на микроскопе. Через 24 ч клетки трансфицировали флуоресцентно-меченой РНК (10 нМ) в комплексе с липофектаминоном и инкубировали в течение 24 ч при 37°C . Контрольные клетки инкубировали с гидролизатом флуоресцентно-меченого аналога в присутствии липофектамина. После инкубации среду убирали, клетки промывали двумя сменами буфера PBS, окрашивали в течение 2-х часов красителем Hoechst (окраска ядер), и фиксировали 4% формалином в течение 10 мин. Формалин удаляли и клетки промывали тремя сменами PBS. Фиксированные препараты красили Alexa Fluor® 594 Phalloidin (Thermo Fisher Scientific) (окраска цитоскелета) в течение 10 минут. При работе с предметным стеклом его покрывали покровным стеклом с несколькими каплями Antifade и затем анализировали на конфокальном микроскопе.

29 Анализ стабильности радиоактивно меченых аналогов мРНК в клетках человека

Клетки MCF-7 трансфицировали $5'$ - $[^{32}\text{P}]$ -мечеными аналогами мРНК в комплексе с липофектаминоном в течение 24 ч. Суммарную РНК трансфицированных клеток выделяли реагентом Лира, разделяли в 10% денатурирующем ПААГ и проводили автордиографию радиоактивно меченой РНК в геле. Параллельно в геле анализировали $5'$ - $[^{32}\text{P}]$ -меченые олигорибонуклеотиды различной длины.

30 Анализ изменения уровня экспрессии генов в клетках человека, трансфицированных аналогами мРНК

Обратную транскрипцию с последующей амплификацией (90°C – 10 с, 65°C – 15 с, 72°C – 15 с) суммарной РНК клеток MCF-7/SKOV3 со специфическими праймерами проводили в реакционной смеси БиоМастер ОТ-ПЦР SYBR Blue (2×) («Биолабмикс», Новосибирск) в режиме реального времени на приборе Light Cycler 96 (Roche). Данные анализировали с помощью программного пакета Light Cycler 96 Software 1.1 (Roche). Контрольные клетки инкубировали в среде с липофектаминам без РНК. Для нормировки количества мРНК использовали уровень мРНК гена GAPDH. Для определения специфичности праймеров продукты ОТ-ПЦР анализировали в 2% агарозном геле, либо в 8% ПААГ.

31 Определение жизнеспособности клеток с помощью МТТ-теста

Клетки культивировали в 96-луночной планшете в количестве 3×10^3 на лунку. Через 24 ч в культуральную среду с клетками добавляли раствор РНК (в комплексе с липофектаминам) до концентрации 10–80 нМ, и инкубировали клетки в течение 3 суток при 37°C в атмосфере 5% CO₂. Контрольные клетки инкубировали в тех же условиях в среде с липофектаминам. Затем в среду добавляли раствор МТТ в буфере PBS до конечной концентрации 0,5 мг/мл. После инкубации клеток с раствором МТТ в течение 120–180 мин при 37°C среду удаляли и растворяли кристаллы МТТ-формаза в 100 мкл ДМСО. Оптическую плотность раствора определяли на длине волны 570 нм на многоканальном спектрофотометре Apollo 8 LB 912 (Berthold Technologies). Данные представляли в виде значения ((МТТ-индекс трансфицированных клеток)/(МТТ-индекс контрольных клеток)) $\times 100\%$ с указанием стандартного отклонения как минимум трех независимых экспериментов.

32 Подготовка препаратов суммарной РНК клеток человека для дифференциального анализа экспрессии генов

Клетки человека SKOV3 трансфицировали аналогами мРНК (10 нМ), а также синтетическим фрагментом мРНК гена GFP89 в комплексе с липидными трансфицирующими агентами: липофектаминам RNAiMAX. Контрольные клетки инкубировали в среде с трансфицирующими агентами без РНК. После 48 часов инкубации

среду удаляли, клетки дважды промывали PBS буфером, с контролем на микроскопе, и лизировали реагентом Тризол в расчете 1 мл на 1,5 млн клеток. Полученные лизаты хранили на -70°C . Выделение суммарной РНК клеток, конструирование ДНК-библиотек в соответствии со стандартными рекомендациями Illumina и массовое параллельное секвенирование на платформе Illumina NextSeq было проведено на базе Междисциплинарного центра коллективного пользования Института фундаментальной медицины и биологии Казанского (Приволжского) федерального университета (г. Казань). Характеризация исходных препаратов суммарной РНК и полученных библиотек проводили с использованием капиллярного электрофореза на приборе Agilent 2100 bioanalyzer.

33 Биоинформатический анализ дифференциальной экспрессии генов

Биоинформатический анализ включал следующие этапы. Тримминг производился при помощи программы Trimmomatic v 0.35, производили тримминг парных прочтений со следующими параметрами: CROP:75 LEADING:3 TRAILING:3 SLIDINGWINDOW:4:15 MINLEN:35. Картирование производилось при помощи программы STAR v.2.5.2.b против аннотации gencode (v. GRCh37.p13) с параметрами: outFilterMultimapNmax 10; outFilterIntronMotifs RemoveNoncanonical; outFilterType BySJout; alignSJoverhangMin 8; alignSJDBoverhangMin 1; outFilterMismatchNmax 999; outFilterMismatchNoverLmax 0.04; alignIntronMin 20; alignIntronMax 1000000. Расчет дифференциальной экспрессии генов производился с помощью программы Htseq+Edger.

Для подсчета количества прочтений для каждого гена использовали Htseq-count (с параметрами: stranded=no; mode=intersection-nonempty). Был использован Edger пакет языка программирования R для проведения теста дифференциальной представленности генов. Гены являлись дифференциально представленными, если $p\text{value} < 0,05$ без поправки на fdr .

Дифференциальный сплайсинг был посчитан с помощью программы Rmats. Для того, чтобы запустить Rmats нужны прочтения одинаковой длины, поэтому на этапе тримминга прочтения были подрезаны до длины 69 (HEADCROP:2 CROP:69 MINLEN:69). Картировались такие прочтения с теми же параметрами. Событие являлось дифференциальным если $fdr < 0,05$.

ГЛАВА III. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Многие работы, посвященные изучению возникновения резистентности к той или иной терапии, сводятся к изучению того, что происходит в самих опухолевых клетках через разные промежутки времени после стрессового воздействия. Таким образом, в публичных репозиториях доступно большое количество данных по дифференциальной экспрессии генов, полученных с использованием гибридизационных микрочипов на различных клеточных культурах после воздействия на них самых разнообразных химиопрепаратов или облучения [9-11]. Гораздо меньше встречается работ, посвященных изучению протеомного состава таких клеток [165, 166]. Однако если учесть, что большая часть клеток опухоли является чувствительной к терапии, то в работах такого рода мы видим преимущественно сигналы от гибнущих клеток и остается неизвестным, что происходит в резистентных клетках. Весьма важно, на наш взгляд, при изучении возникновения резистентности обращать внимание на секретом обработанных химиопрепаратами или радиацией опухолевых клеток, поскольку имеются доказательства того, что культивирование интактных опухолевых клеток с секретомы от погибающих клеток способно повышать метаболическую активность, клеточную миграцию, а также устойчивость к апоптозу интактных опухолевых клеток [2-4, 167]. Из чего можно сделать вывод, что секретируемые белки, РНК и метаболиты ответственны за коммуникацию между раковыми клетками, а также между остальными неонкотрансформированными клетками микроокружения. В такого рода исследованиях, насколько нам известно, секретомы от различных раковых клеточных линий изучали только при нормальных условиях (без какого-либо стрессового воздействия), а сравнение их с секретомы после химио- или радиотерапии не проводили. Наконец, большинство литературных данных описывает лишь секретомы клеток, культивируемых *in vitro* [49, 50], в то время как данных *in vivo*, в особенности полученных не на модельных животных, а с использованием клинических образцов от пациентов со злокачественными новообразованиями, почти нет. Поэтому в данном исследовании основной акцент будет сделан на изучении особенностей секреции раковых клеток в ответ на стресс, индуцированный действием химиотерапии.

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 опухолеассоциированных иммунных клеток (Т клетки и макрофаги) 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, регуляторных липидов, внеклеточных везикул и других важных компонентов [48, 168]. Однако основные механизмы, лежащие в основе межклеточной коммуникации, остаются неизвестными. Знание состава асцитов может дать важную информацию о росте и прогрессии рака яичника, а изучение секретомов клеток рака яичника до и после курсов химиотерапии, 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 (Таблица 1).

1.1 Метаболомный анализ опухолевых асцитов и асцитов от пациенток с циррозом

Для того, чтобы выявить различия в представленности метаболитов между асцитами при раке яичника и асцитами пациенток с портальным алкогольным циррозом (Таблица 1), мы воспользовались масс-спектрометрией, совмещенной с газовой хроматографией. Анализ был проведен для 7 индивидуальных опухолевых асцитов и 4 индивидуальных асцитов от пациенток с циррозом в трех технических повторах.

В результате нашего метаболомного анализа было детектировано 129 компонентов, 89 из которых были идентифицированы как известные метаболиты [8]. Метод главных компонент (principal component analysis, PCA) продемонстрировал четкое разделение между опухолевыми асцитами и асцитами от пациенток с циррозом (Рисунок 8). Согласно непараметрическому тесту Манна-Уитни ($p < 0,05$) с поправками по Хохбергу и Бенджамини, статистически значимо отличался 41 компонент (Таблица 3). При этом более одной трети метаболитов было идентифицировано исключительно в опухолевых асцитах. 2-гидроксивалерат был наиболее пониженным, в то время как глюкозо-1-фосфат был наиболее повышенным метаболитом в опухолевых асцитах. Также количества гликолевой

кислоты, глюкозы, фуранозы и фруктозы были значительно понижены в опухолевых асцитах относительно циррозных образцов. При этом глицерол-3-фосфат, холестерин, церамид (18:1) и моноацилглицерол (18:0/0:0/0:0) были значимо повышены. Наиболее важные отличия были обнаружены в представленности жирных кислот, холестерина, церамида, глицерол-3-фосфата, глюкозы и глюкозо-3-фосфата (Таблица 3).

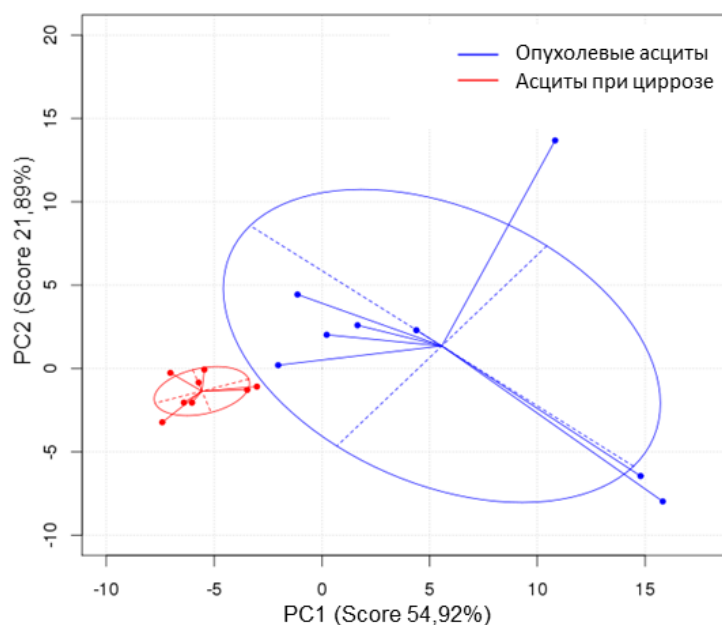


Рисунок 8 – Метод главных компонент всех идентифицированных метаболитов (n=89) отражает значительную разницу между опухолевыми асцитами (синий цвет) и асцитами от пациенток с циррозом (красный цвет).

Пониженные уровни глюкозы в опухолевых асцитах относительно асцитов от пациенток с циррозом могут быть ассоциированы с эффектом Варбурга [169]. 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), детектируемый исключительно в опухолевых образцах (Рисунок 9). Ранее было показано, что абберантная экспрессия TGM2 является важным регулятором эффекта Варбурга в эпителиальных клетках [170].

Таблица 3 – Дифференциально представленные метаболиты в опухолевых асцитах и в асцитах от пациенток с циррозом, согласно тесту Манна-Уитни

Название метаболита	log ₂ (опухолевые/циррозные асциты)	Время удержания, мин.	p,value	p,adjust
Amide of linoleic acid (aC18:2)	+	24,64	7,64E-02	1,33E-01
Amide of oleic acid (aC18:1)	+	24,74	1,28E-02	3,46E-02

Продолжение Таблицы 3

Amide of pentadecanoic acid (aC15:0)	+	21,86	1,28E-02	3,46E-02
Amide of stearic acid (aC18:0)	+	25,11	4,57E-03	2,02E-02
Arachidic acid (aC20:0)	+	29,84	1,28E-02	3,46E-02
Arachidonic acid (ac20:4)	+	28,89	4,57E-03	2,02E-02
Behenic acid (ac22:0)	+	32,35	7,64E-02	1,33E-01
Capric acid (aC10:0)	+	13,74	1,46E-03	1,36E-02
Ceramide (d1c18:1)	+	43,68	4,57E-03	2,02E-02
Cholesta-4,6-dien-3-ol	+	35,23	1,46E-03	1,36E-02
Cholesteryl acetate	+	35,09	4,53E-03	2,02E-02
Docosahexaenoic acid (aC22:6)	+	31,39	4,57E-03	2,02E-02
Eicosadienoic acid (aC20:2)	+	29,45	1,71E-01	2,22E-01
Eicosenoic acid (aC20:1)	+	29,51	1,28E-02	3,46E-02
Glycero-3-phosphate	+	19,97	1,36E-02	3,62E-02
Lauric acid (ac12:0)	+	17,53	8,26E-04	1,34E-02
Lignoceric acid (ac24:0)	+	34,71	7,64E-02	1,33E-01
LPA 16:0	+	37,32	1,28E-02	3,46E-02
MAG(18:1/0:0/0:0)	+	33,95	1,28E-02	3,46E-02
Methyl phosphate (2TMS)	+	8,12	4,10E-04	8,88E-03
Myristic acid (aC14:0)	+	21,01	2,19E-02	5,48E-02
nOH14:0	+	19,55	1,28E-02	3,46E-02
Palmitoleic acid (aC16:1)	+	23,87	1,27E-02	3,46E-02
Glucose-1-Phosphate	4,6	27,24	1,22E-02	3,46E-02
Stearic acid (aC18:0)	2,7	27,14	1,35E-03	1,36E-02
Cholesterol	2,6	38,46	1,55E-04	6,73E-03
Linoleic acid (aC18:2)	2,5	26,69	9,31E-04	1,34E-02
Palmitic acid (aC16:0)	1,6	24,21	2,95E-03	2,02E-02
Oleic acid (aC18:1 1)	1,4	26,85	1,25E-01	1,98E-01
Vaccenic acid (aC18:1 2)	1,2	26,76	2,95E-03	2,02E-02
Glycolate (2TMS)	-1,6	6,12	1,55E-04	6,73E-03
2-hydroxybutanoate (2TMS)	-1,8	7,09	3,11E-04	8,88E-03
Furanose	-3,1	21,38	1,48E-02	3,84E-02
Glucose	-3,4	22,26	1,09E-03	1,36E-02
Fructose	-4,9	21,45	6,22E-04	1,15E-02
Galacturonic acid	-5,0	22,12	1,89E-03	1,64E-02
2-hydroxyisovalerate (2TMS)	-5,1	7,83	1,55E-04	6,73E-03
2,4-dihydroxybutanoate (3TMS)	-	13,07	1,28E-02	3,46E-02
Pyranose 1853	-	20,99	1,28E-02	3,46E-02
Sorbitol	-	23,05	4,10E-04	8,88E-03
Xylitol	-	19,07	1,28E-02	3,46E-02

Примечание: “+” – метаболиты, которые были идентифицированы только в асцитах при раке яичника; “-” – метаболиты, которые были идентифицированы только в асцитах при циррозе; TMS - триметилсилил (trimethylsilyl) (защитная группа). Положительные и отрицательные значения \log_2 (опухолевые/циррозные асциты) указывают относительные повышенные или пониженные концентрации, соответственно, в опухолевых асцитах по сравнению с асцитами от пациенток с циррозом.

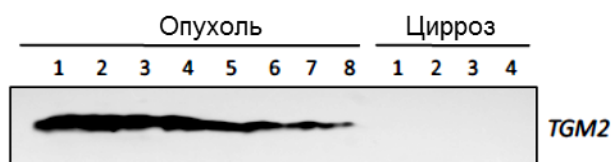


Рисунок 9 – Представленность трансглутаминазы 2 (TGM2) в опухолевых асцитах и асцитах от пациенток с циррозом, определенная методом иммуноблота.

Производные жирных кислот значительно отличали опухолевые асциты от асцитов, возникших при циррозе. Известно, что онкогенные сигнальные пути напрямую и косвенно влияют на активацию синтеза жирных кислот [171, 172]. Помимо обеспечения клеток энергией липиды, входящие в их состав жирные кислоты и их амиды, являются важными сигнальными молекулами. Они служат посредниками и модуляторами в передаче внутриклеточных сигналов, вмешиваются в окислительный метаболизм и могут влиять на экспрессию генов, являясь лигандами для специфических ядерных рецепторов. С другой стороны, производные жирных кислот, такие как церамиды также могут служить вторичными мессенджерами [173]. Одна из таких молекул, церамид (18:1), была идентифицирована нами только в опухолевых асцитах.

Лизофосфатидиловая кислота (16:0) (LPA), идентифицированная в нашем метаболомном исследовании только в опухолевых асцитах, является идиопатическим фактором микроокружения опухоли яичника. Известно, что ее уровни увеличиваются в крови и асцитных жидкостях пациенток с этой разновидностью рака. Существует большое количество доказательств, что LPA вовлечена в сигнальные каскады, способствующие инициации, развитию и метастазированию рака яичника, кроме того, LPA вызывает образование воспалительных цитокинов, которые способствуют выживаемости раковых клеток и определяют их более агрессивное поведение [174-176].

Таким образом, видно, что для опухолевых образцов характерны повышенные уровни биосинтеза жирных кислот и холестерина. Это может приводить к увеличению количества липидов с различными сигнальными функциями, которые могут вносить важный вклад в развитие опухоли. Липиды также формируют структурную основу для паракринных гормонов и факторов роста, таких как простагландины, лейкотриены, LPA и стероидные гормоны.

1.2 Протеомный анализ опухолевых асцитов и асцитов от пациенток с циррозом

1.2.1 Разработка подхода к фракционированию асцитов

Нами был проведен сравнительный анализ протеомов асцитов пациенток с диагнозом аденокарцинома яичника и асцитов пациенток с портальным алкогольным циррозом (Таблица 1). Протеомный анализ асцитов проводился в трех повторах с использованием пула из 10 асцитов от пациенток с аденокарциномой яичника и пула из 5 асцитов от пациенток с портальным алкогольным циррозом (Рисунок 10).

Протеом асцитических жидкостей, так же, как и протеом сыворотки крови, содержит большое количество мажорных белков, которые могут составлять 65–97% от доли всех белков в образце (Рисунок 6). Высокий динамический диапазон концентраций белков в этих биологических жидкостях (более 10 порядков величин) [177] серьезно затрудняет их протеомный анализ. Для решения этой проблемы используют различные методы предварительного фракционирования исследуемого материала перед их LC-MS/MS анализом [46-48, 139, 150]. Чтобы сократить динамический диапазон концентраций в асцитах, мы разработали собственную схему фракционирования [8, 178, 179]. Были использованы комбинаторные гексапептидные лигандные библиотеки (combinatorial peptide ligand library, CPLL) с последующим разделением выделенных белков электрофорезом в низкопроцентном полиакриламидном геле. Поскольку обработка образцов CPLL приводит к потере некоторых белков (в настоящее время такие потери оцениваются в 3-7% [150]), также было произведено фракционирование образцов в низкопроцентном полиакриламидном геле без их предварительной обработки CPLL. Далее, белковые фракции подвергали восстановлению и алкилированию дисульфидных связей с последующим трипсинолизом в геле и LC-MS/MS анализом (Рисунок 10).

Таким образом, нами было идентифицировано 2096 белков в опухолевых асцитах [8], что в несколько раз превышает количественные показатели опубликованных ранее данных (а именно, 229 белков в исследовании [48], 445 белков в исследовании [139], и 484 белков в исследовании [47]). При сравнении полного списка белков, идентифицированных в асцитах при раке яичника в нашем исследовании, с объединенным списком белков из предыдущих работ (626 белков [47]) перекрытие составило 100%.

Из полученных нами результатов видно, что использование CPLL с последующим разделением белков асцитов электрофорезом в низкопроцентном полиакриламидном геле перед их LC-MS/MS анализом существенно увеличивало количество идентифицируемых

белков. Распределение белков, идентифицированных в опухолевых асцитах и асцитах от пациенток с циррозом для каждого эксперимента, представлено на рисунке 11А-Б.

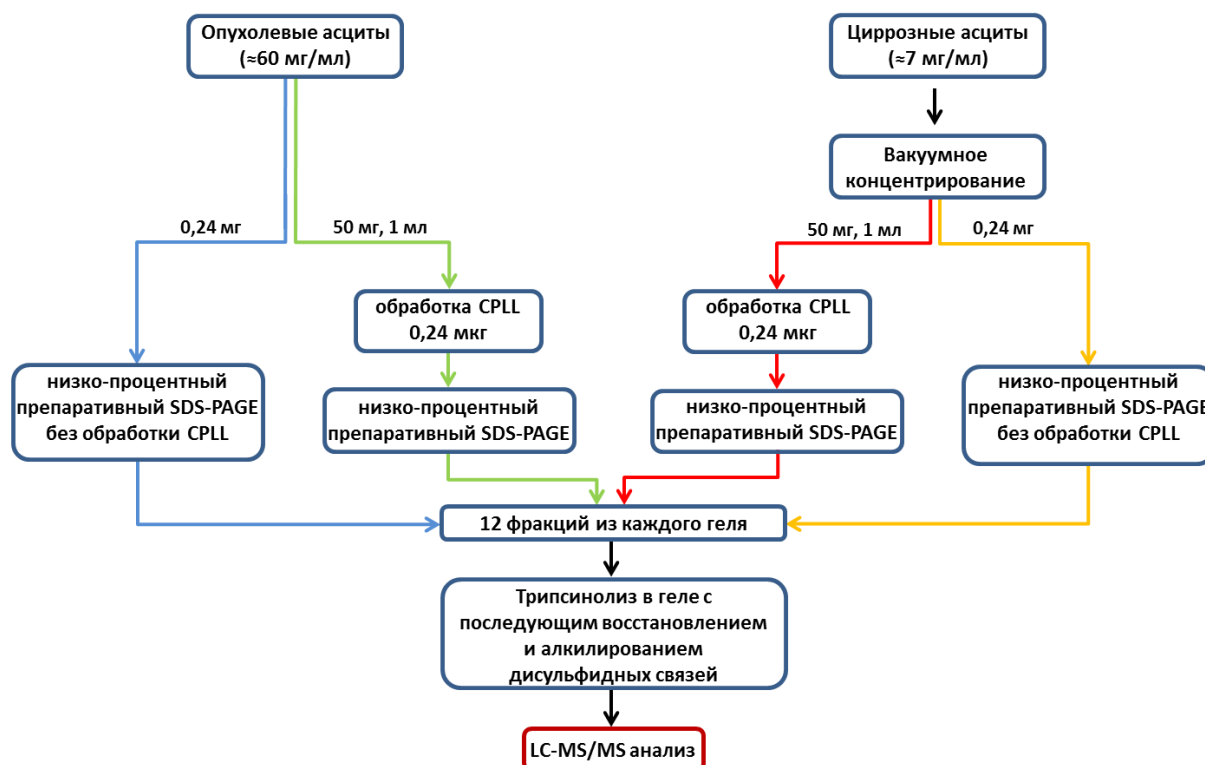


Рисунок 10 – Схема фракционирования асцитов от пациенток с аденокарциномой яичника и асцитов от пациенток с циррозом перед их масс-спектрометрическим анализом.

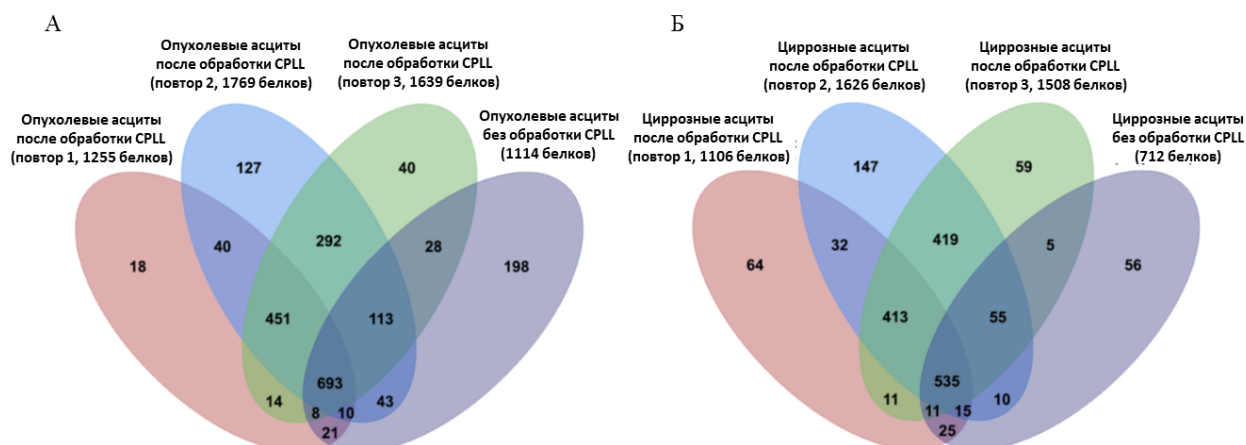


Рисунок 11 – Распределение белков, идентифицированных в опухолевых (А) асцитах и асцитах от пациенток с циррозом (Б) в индивидуальных экспериментах (с и без обработки CPLL).

При сравнении результатов наших протеомных исследований со списком потенциальных маркеров рака яичников, который был сгенерирован на основе анализа литературных данных Kuk et al. [139] нами было обнаружено 32 из 39 белков-кандидатов в биомаркеры рака яичников (Приложение 1). При сравнении списков белков опухолевых асцитов, асцитов от пациенток с доброкачественными новообразованиями [46] 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 нам выявить 424 белка (Рисунок 12), специфичного для опухолевых асцитов.



Рисунок 12 – Сравнительный анализ протеомов опухолевых асцитов (зеленая окружность), асцитов от пациенток с циррозом (синяя окружность) и асцитов при доброкачественных новообразованиях (розовая окружность).

Чтобы подтвердить данные LC-MS/MS анализа мы проверили наличие нескольких белков, важных для раковых клеток методом Вестерн-блота: TGM2 (белок внеклеточного матрикса [170]), Hsp90 (внутриклеточный и экзосомальный белок [180]), U2AF1, U2AF2 и HNRHPU (внутриклеточные сплайсосомальные белки [181]) (Рисунок 9, 13).

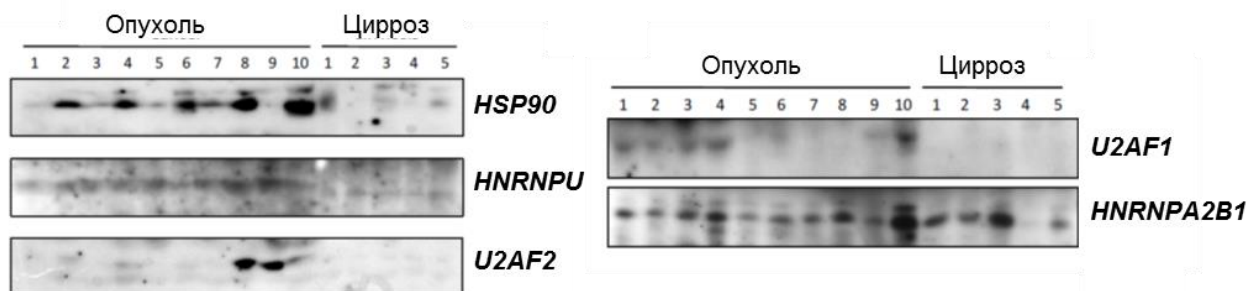


Рисунок 13 – Представленность белков HSP90, HNRNPU, U2AF2, U2AF1 и HNRNPA2/B1 в опухолевых асцитах и в асцитах от пациенток с циррозом, определенная методом иммуноблота.

Согласно результатам иммуноблота, количество белка Hsp90 было значительно выше в раковых образцах, что соответствует данным LC-MS/MS, в котором количество спектров, идентифицированных как пептиды Hsp90, было в 14,5 раз больше в опухолевых асцитах относительно асцитов от пациенток с циррозом. TGM2, U2AF1, U2AF2 и HNRHPU были детектированы исключительно в раковых образцах и методом

иммуноблота, и LC-MS/MS анализом. Таким образом, нам удалось подтвердить данные LC-MS/MS анализа независимым методом.

1.2.2 NTA анализ показал, что опухолевые асциты обогащены повышенным количеством экзосом

Анализ списка белков, специфичных для опухолевых асцитов, при помощи баз данных UniProtKB, NCBI и ExoCarta показал, что большинство из них потенциально могут быть секретлируемыми: 34% приходится на белки внеклеточного пространства и 40% были обнаружены ранее в составе внеклеточных везикул (Рисунок 14А).

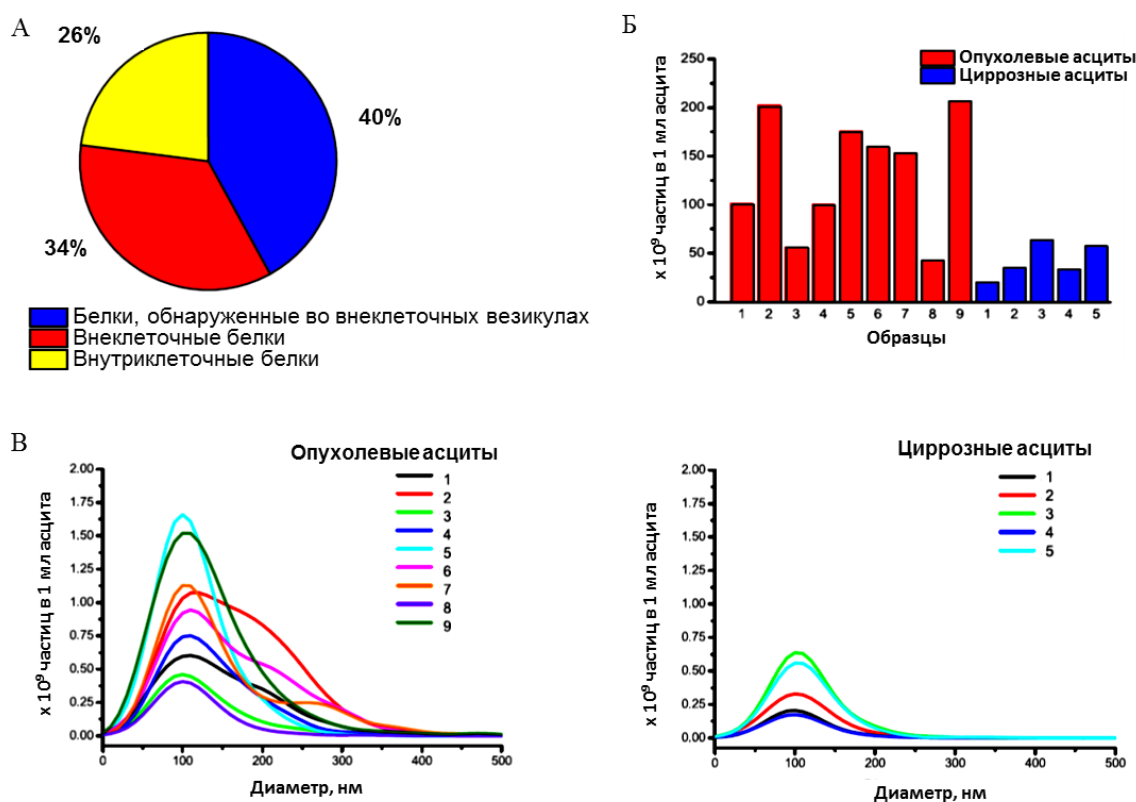


Рисунок 14 – А, Локализация белков, уникальных для опухолевых асцитов: внеклеточные белки (красный сектор), внутриклеточные белки (желтый сектор) и белки, обнаруженные в составе внеклеточных везикул (микровезикул и экзосом) (синий сектор). Б, количество экзосом, выделенных из опухолевых асцитов (красные столбцы) и асцитов от пациенток с циррозом (синие столбцы). 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 рисунка 14Б-В, количество везикул, выделенных из опухолевых асцитов, значительно

превышает количество везикул в циррозных образцах, что хорошо согласуется с нашими протеомными данными.

1.2.3 Полуколичественный анализ и выявление значимых отличий в опухолевых асцитах по сравнению с контрольными

На следующем этапе мы провели количественный анализ белков, идентифицированных в трех технических повторах, между образцами асцитов опухолевого и циррозного происхождения с помощью метода “total spectral count”.

Ранее было показано, что процедура обогащения с использованием CPLL сохраняет относительную количественную информацию [182, 183]. При добавлении в исследуемые образцы конкретных белков в нескольких известных концентрациях с последующей обработкой CPLL была обнаружена хорошая воспроизводимость MS-сигнала между повторами и линейная зависимость MS-сигнала с повышением концентрации белков. Таким образом, относительный количественный анализ протеома различных образцов возможен после применения CPLL в случае, если белок не насыщает емкость связывания со своим лигандом. Согласно предыдущим исследованиям, количественное определение белков после обработки CPLL возможно в диапазоне концентраций, охватывающем, по меньшей мере, 3 порядка [182, 183].

Проведенные анализы наших масс-спектрометрических данных методами главных компонент (PCA) и наименьших квадратов (partial least squares regression, PLS) выявили четкую дифференциацию, разделив исследованные образцы на две основные группы: образцы, принадлежащие пациенткам с аденокарциномой яичника, и образцы пациенток с циррозом (Рисунок 15).

Представленность белков в двух группах (рак яичника и цирроз) сравнивали путем построения линейных моделей с помощью пакета “limma” языка программирования R, включая анализ линейных контрастов между сравниваемыми группами. Статистически значимо отличались 1199 белков. За биологически значимые мы считали отличия в 4 раза, чтобы максимально удалить из рассмотрения белки, которые относятся к общему системному ответу на образование асцита. Таким образом, представленность 702 белков была повышена и 440 белков – понижена для группы опухолевых асцитов по сравнению с циррозными образцами.

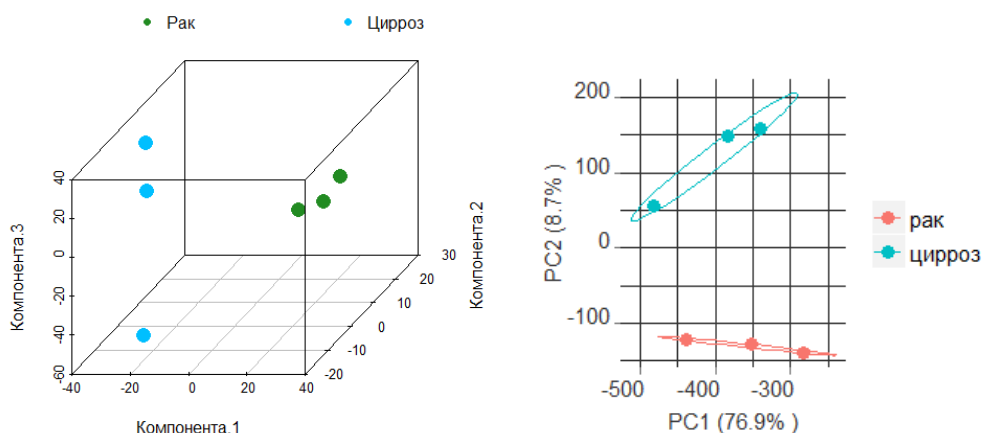


Рисунок 15 – Метод главных компонент (левая панель) и метод частичных наименьших квадратов (правая панель) всех идентифицированных белков отражает значительные различия между опухолевыми асцитами и асцитами от пациенток с циррозом.

Мы проанализировали дифференциально-представленные белки в опухолевых асцитах и асцитах при циррозе с использованием баз данных KEGG и Gene Ontology. В частности, анализ по базе данных KEGG продемонстрировал, что кластер белков сплайсосомы (белков, участвующих в сплайсинге пре-мРНК) был наиболее значимо представлен в опухолевых асцитах по сравнению с асцитами от пациенток с циррозом (Рисунок 16). Аналогичные результаты были получены при использовании базы данных GO Biological Processes (Приложение 2).

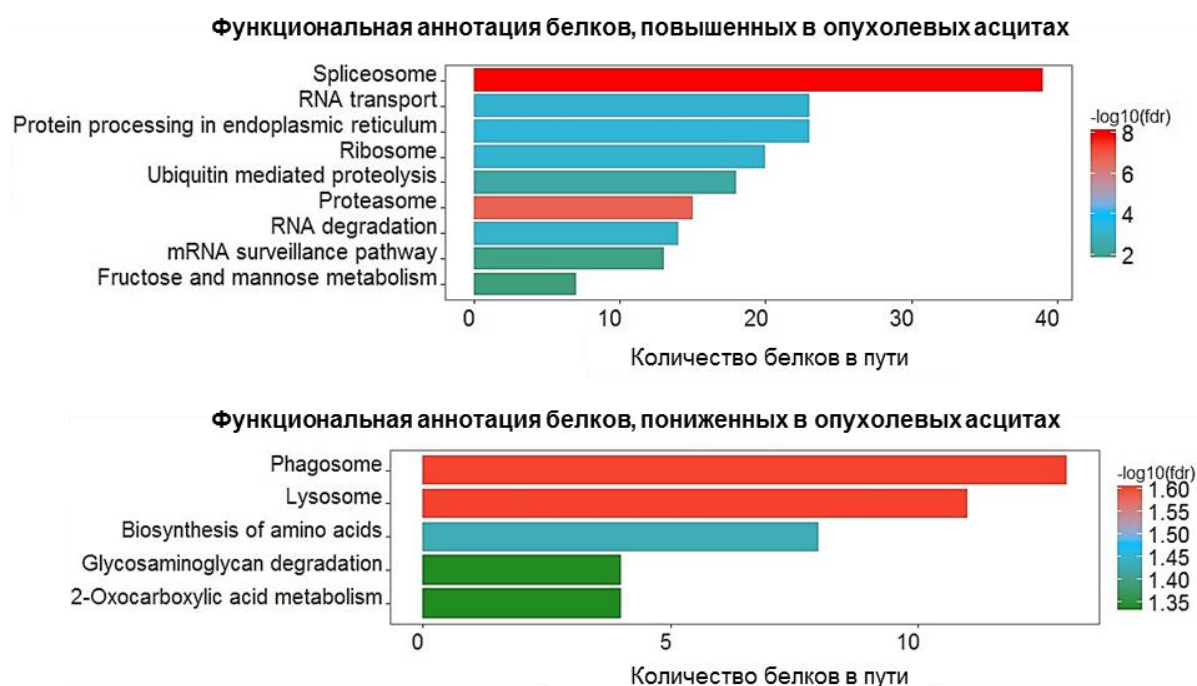


Рисунок 16 – Статистически значимые ($p < 0,05$) кластеры белков, дифференциально повышенных (верхняя панель) и пониженных (нижняя панель) в образцах опухолевых асцитов по сравнению с асцитами при циррозе. Данные обогащения получены с использованием базы данных KEGG.

Эти данные представляют особый интерес, так как, известно, что в опухолевых клетках процесс сплайсинга существенно изменен по сравнению с нормальными клетками [181, 184-186], а также некоторые сплайсосомные белки были предложены как перспективные мишени для химиотерапии [187-189].

1.3 Полуколичественный анализ и выявление значимых отличий в опухолевых асцитах до и после химиотерапии

В случае, если асцит при раке яичника остается после курса неoadъювантной химиотерапии или возникает на ее фоне, это свидетельствует о неэффективности лечения и плохом прогнозе, так как их наличие говорит о возникновении резистентности к применяемым химиопрепаратам. Благодаря имеющейся в нашем распоряжении коллекции асцитов от одних и тех пациенток с аденокарциномой яичника до и после химиотерапии (Таблица 2), далее было исследовано, как изменяется секреция раковых клеток на фоне химиотерапии в естественном микроокружении. Для этого, мы вновь воспользовались обработкой биологических жидкостей CPLL перед LC-MS/MS анализом, после чего был проведен количественный анализ (методом “total spectral count”) белков, идентифицированных в двух технических повторах, между тремя парами асцитов до и после нескольких курсов неoadъювантной химиотерапии (Таблица 2).

В целом, нами было идентифицировано 1775 белков в опухолевых асцитах. Далее, мы сравнили списки белков опухолевых асцитов до и после химиотерапии, и асцитов от пациенток с циррозом (из пункта 1.2.1) (Рисунок 17).

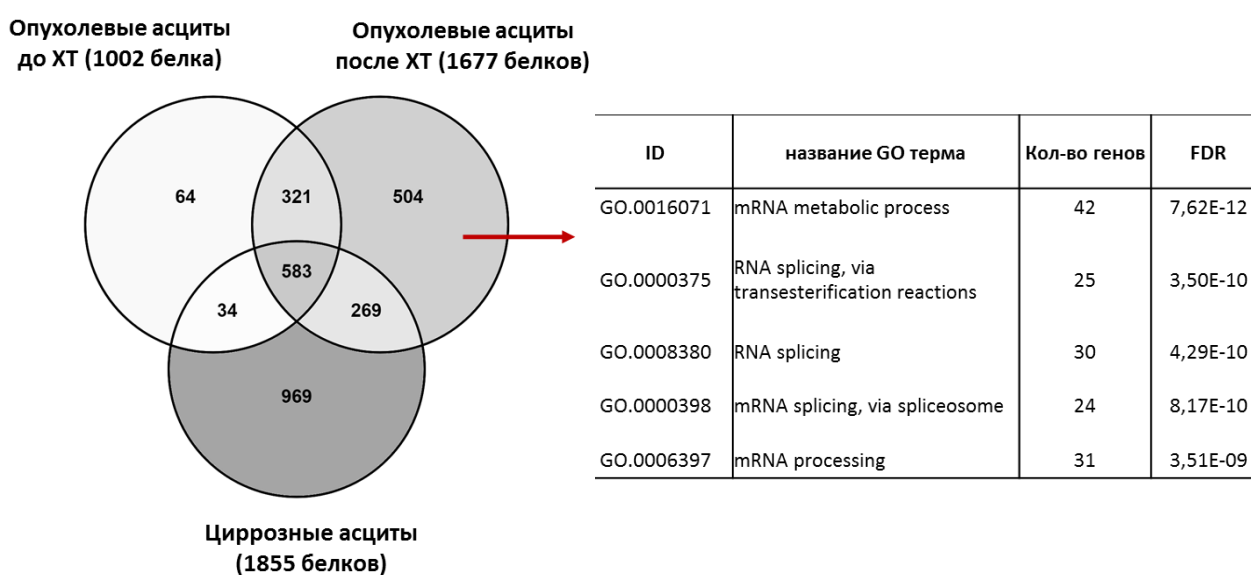


Рисунок 17 – Сравнительный анализ протеомов асцитов при раке яичников до и после курсов неoadъювантной химиотерапии (ХТ), и асцитов при циррозе.

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. После проведения древовидной кластеризации оказалось, что асциты кластеризуются не по индивидуальным пациентам, что можно было бы ожидать, а по тому, был ли асцит отобран до или после терапии (Рисунок 18). Таким образом, можно сделать вывод что химиотерапия вызывает существенное изменение состава асцитических жидкостей и эти изменения сходны в образцах, полученных от всех пациенток.

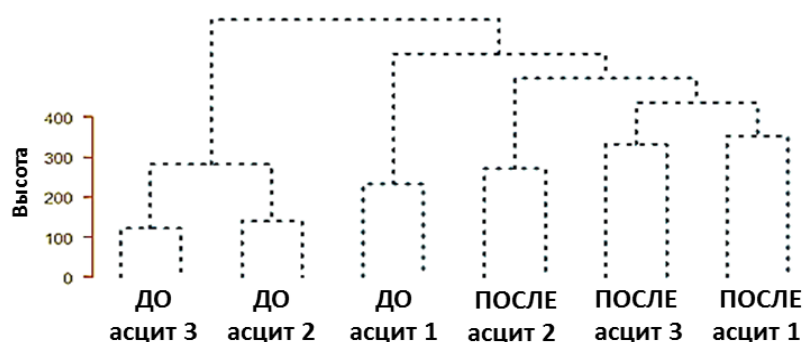


Рисунок 18 – Древовидная кластеризация по идентифицированным белкам асцитов до и после химиотерапии.

Для выявления перечня дифференциально представленных белков между асцитами до и после химиотерапии использовали значение p -value с поправкой на множественное выравнивание FDR с порогом отсечения 0,05. За биологически значимые, в данном случае, мы считали отличия в 2 раза. В результате, представленность 962 белков была повышена и 112 белков – понижена для группы асцитов после химиотерапии по сравнению с асцитами до лечения. Было обнаружено, что представленность большинства известных межклеточных сигнальных медиаторов, таких как цитокины, хемокины и различные факторы роста, падала в образцах асцитов после химиотерапии. Эти данные были подтверждены с помощью цитокинового профилирования, основанного на методе мультиплексного иммуноферментного анализа (Приложение 3) [190].

Чтобы более детально выяснить, как именно изменяется состав асцитов под действием терапии мы провели последующий анализ полученных протеомных результатов с помощью баз данных GO и KEGG. Обогащение по метаболическим путям выявило, что повышенные в асцитах после лечения белки относились преимущественно к кластеру протеасомы (Proteasome), а также вновь мы увидели значимое обогащение по кластеру сплайсосомы (Spliceosome) и РНК транспорта (RNA transport) (Рисунок 19). Кроме того, по результатам анализа по базе данных GO кластер сплайсосомы был на

первом месте по значимости (Приложение 4). Среди пониженных в представленности белков статистически значимых обогащений обнаружено не было.

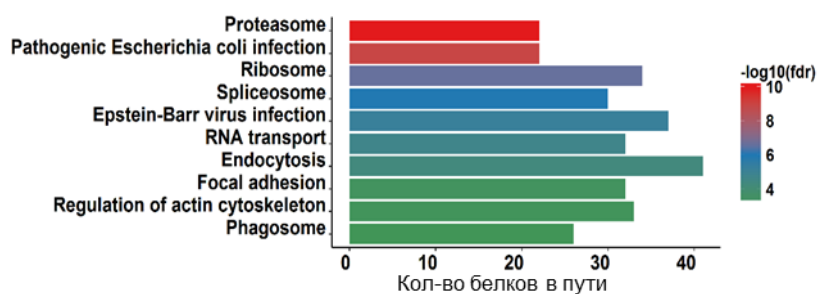


Рисунок 19 – Статистически значимые ($p < 0,05$) кластеры белков, дифференциально повышенных в образцах опухолевых асцитов после лечения. Данные обогащения получены с использованием базы данных KEGG.

Ранее было показано, что высвобождение клетками протеасомных белков происходит в составе везикул, подобных экзосомам, в ответ на клеточный стресс [191]. Кроме того, внеклеточные протеасомы были обнаружены циркулирующими в плазме крови пациентов с различными патологиями, в том числе и со злокачественными новообразованиями. Причем концентрации этих белков в крови пациентов зависели от стадии заболевания и повышались после курсов химиотерапии [192, 193].

Что касается сплайсосомных белков, ранее среди опубликованных работ нигде не было показано, что сплайсосомные белки могут быть экспортированы опухолевыми клетками во внеклеточное пространство после стрессового воздействия.

1.4 Детекция сплайсосомных мяРНК в асцитах

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 [181, 194], причем большая часть из них является регуляторами сплайсинга [189]. 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), количество которой в клетке примерно в 100 раз меньше по сравнению с мажорной сплайсосомой. В состав минорной сплайсосомы входят U11, U12, U4atac, U5, и U6atac мяРНК. Хотя состав мяРНК между двумя типами сплайсосом различен, 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 [195]. Функция этого большого комплекса сплайсосомы заключается в вырезании интронов и «сшивании» экзонов в пре-

матричных РНК. 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 опухолей, а также приводить к возникновению устойчивости к химиотерапии [196].

Обнаружив по результатам протеомного анализа наибольшие различия в представленности белков, относящихся к процессу сплайсинга, мы проверили наличие всех сплайсосомных мяРНК в исследуемых образцах асцитов.

Сначала мы определили относительное содержание мяРНК мажорной сплайсосомы в контрольных (асциты от пациенток с циррозом) и опухолевых асцитах (Таблица 1). Из полученных данных (Рисунок 20А) видно, что наибольшее различие в содержании между сравниваемыми образцами наблюдается для U6 мяРНК.

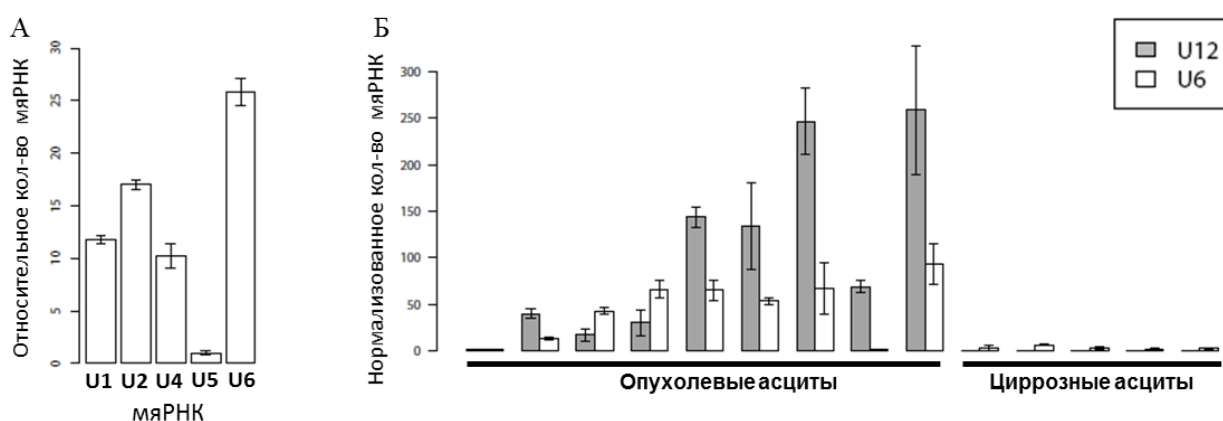


Рисунок 20 – А, относительное повышение количества мяРНК мажорной сплайсосомы в опухолевых асцитах относительно контрольных асцитов от пациенток с циррозом. Б, нормализованное количество U6 мяРНК (светлые столбцы) и U12 мяРНК (темные столбцы) в асцитах опухолевого и циррозного происхождения.

Однако, сравнение содержания U6 мяРНК во всех исследуемых образцах (Рисунок 20Б, светлые столбцы) показало, что, если в контрольных образцах присутствует примерно одинаковое количество U6 мяРНК, то между опухолевыми образцами наблюдаются существенные различия. В семи из девяти опухолевых асцитов количество U6 мяРНК значительно повышено, по сравнению с контролем. Анализ мяРНК, относящихся к U12 сплайсосоме, показал, что в опухолевых асцитах присутствуют все типы мяРНК, характерные для минорной сплайсосомы (U11, U12, U4atac, U6atac), в то время как в асцитах от пациенток с циррозом мяРНК минорной сплайсосомы не было детектировано (данные не представлены). На рисунке 20Б (темные столбцы) приведено сравнение количеств U12 мяРНК во всех исследуемых образцах. Как видно из рисунка эта РНК присутствует во всех опухолевых асцитах и не детектируется ни в одном из контрольных образцов.

Далее, мы изучили, как изменяется состав мяРНК минорной и мажорной сплайсосом в асцитах в ответ на химиотерапию. В анализ были взяты асциты от пациенток из Таблицы 2. Оказалось, что мяРНК, принадлежащие обоим типам сплайсосом, детектируются в опухолевых асцитах как до, так и после химиотерапии (Рисунок 21). Однако, в асцитах после химиотерапии наблюдается значительное повышение представленности всех мяРНК. Эти результаты хорошо коррелируют с нашими протеомными данными (Рисунок 17, 19, Приложение 4), в которых одно из самых значимых отличий между асцитами до и после химиотерапии наблюдалось для белков сплайсосомы.

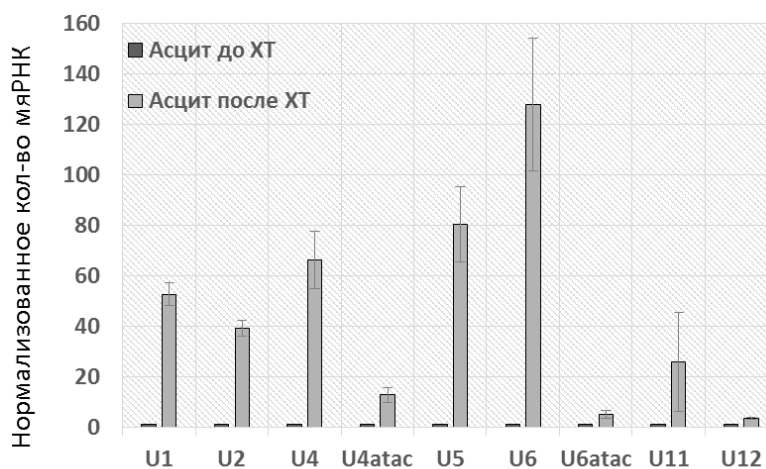


Рисунок 21 – данные ОТ-ПЦР анализа мяРНК в нескольких асцитах пациенток с аденокарциномой яичника до и после курса неоадьювантной химиотерапии (ХТ). Полученные данные были нормализованы на искусственно синтезированный стандарт – фрагмент GFP (89 нк).

Насколько нам известно, это первое исследование, показывающее присутствие полноразмерных форм мяРНК сплайсосомы во внеклеточной среде. Очевидно, что рибонкулеопротеиновые комплексы могут попадать во внеклеточную среду из-за утечки внутриклеточного содержимого, индуцированной апоптозом/некрозом, или могут быть специфично экспортированы из раковых клеток. Чтобы исследовать этот вопрос, мы сравнили относительное содержание U12 мяРНК в клетках рака яичника и в асцитах при раке яичника. Для этого, количество U12 мяРНК было нормализовано на количество 18S рибосомальной РНК (рРНК). Такой метод нормализации был выбран, исходя из того, что, если U12 мяРНК попадает в асцитную жидкость вследствие лизиса опухолевых клеток, то вместе с ней из клеток неизбежно должна выходить и 18S рРНК, как одна из самых представленных типов РНК в клетке. Однако если U12 мяРНК подвергается специфическому экспорту из клетки, то соотношение U12 мяРНК/18S рРНК в асцитной жидкости будет значительно превышать то же соотношение внутри клетки. Из рисунка

22А видно, что относительное содержание U12 мяРНК вне клетки более чем в 10000 раз превышает её относительное количество внутри клетки. Важно отметить, что такой результат не связан с различиями в стабильности исследуемых типов РНК во внеклеточной среде (Рисунок 22Б). Вышеперечисленные эксперименты свидетельствуют в пользу того, что U12 мяРНК попадает во внеклеточную среду не из-за апоптоза или некроза, а благодаря активному экспорту из клеток.

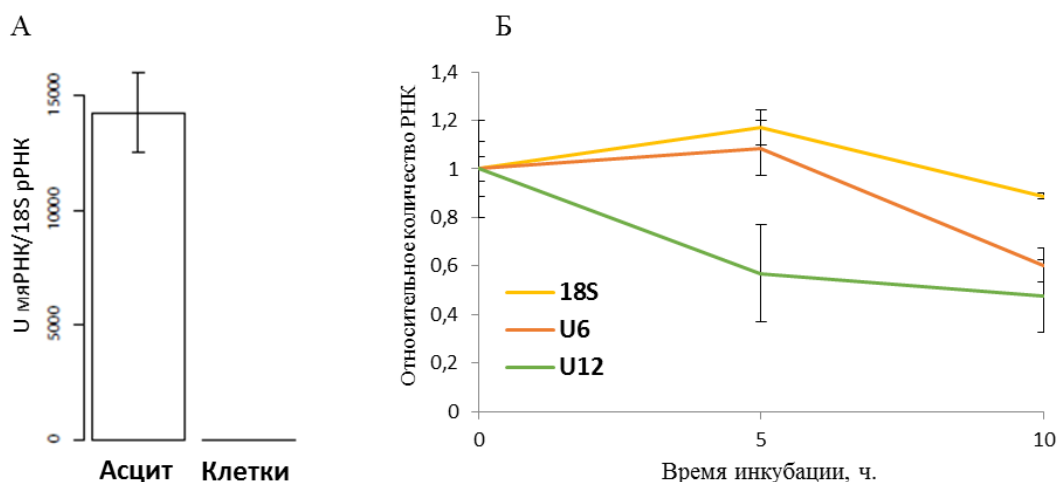


Рисунок 22 – А, относительное количество U12 мяРНК в клетках аденокарциномы яичника SKOV3 и опухолевых асцитах. Б, Оценка стабильности РНК в асцитных жидкостях. Опухолевые асциты инкубировали при +37°C в течение указанного времени. Количество 18S рРНК, U6 и U12 мяРНК были определены методом ОТ-ПЦР после инкубации.

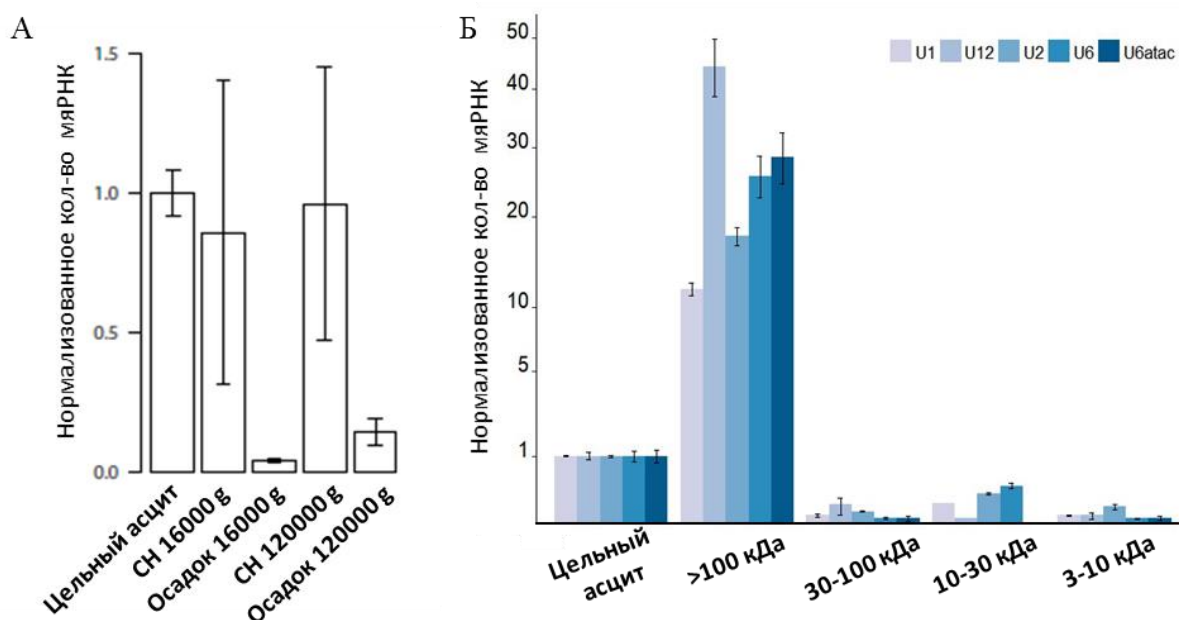


Рисунок 23 – А, нормализованное количество U12 мяРНК во фракциях, полученных с помощью дифференциального центрифугирования. (СН – супернатант). Б, нормализованное количество мяРНК в различных фракциях асцита после химиотерапии. Фракции были получены с помощью картриджей для ультрафильтрации с отсечкой по молекулярной массе 3 кДа, 10 кДа, 30 кДа и 100 кДа. Представлено среднее значение изменения мяРНК с указанием стандартного отклонения, рассчитанного по данным трех независимых экспериментов. Произведено квадратичное преобразование шкалы Y.

РНК могут быть экспортированы из клеток в комплексе с белками переносчиками, или же в составе внеклеточных везикул [197-199]. Чтобы определить локализацию мяРНК, мы проанализировали наличие U12 мяРНК во фракциях, полученные после дифференциального центрифугирования асцитов (Рисунок 23А). Из рисунка видно, что U12 мяРНК детектировалась как в супернатанте, так и после центрифугирования при 16000 g (фракция микровезикул) и 120000 g (фракция экзосом). Кроме того, анализ распределения мяРНК в различных фракциях асцита показал, что фракция больше 100 кДа была наиболее обогащена всеми типами мяРНК (Рисунок 23Б). Таким образом, мяРНК могут секретироваться либо в составе везикул, преимущественно экзосом, либо присутствовать во внеклеточной среде в виде неседиментирующих рибонуклеопротеидных комплексов.

1.5 Опухолевые асциты вносят вклад в формирование резистентности *de novo*

На следующем этапе мы исследовали, как опухолевые асциты после химиотерапии могут влиять на фенотип и поведение раковых клеток. Для этого нами были получены три первичные культуры клеток рака яичника, которые были выделены из опухолевых асцитов до лечения (Таблица 2). Далее эти клеточные культуры были инкубированы в течение трех дней с аутологичными асцитными жидкостями (25% об./об.) от пациенток до и после химиотерапии, после чего клетки обрабатывали цисплатином (IC50). С помощью МТТ теста было выяснено, что асцитные жидкости именно после химиотерапии значительно увеличивают устойчивость опухолевых клеток к последующему действию препарата (Рисунок 24А). Кроме того, мы показали, что опухолевые асцитные жидкости после химиотерапии повышают подвижность раковых клеток (Рисунок 24Б). Хорошо известно, что повышенная подвижность является особенностью более агрессивных раковых клеток с мезенхимальным фенотипом. Поэтому мы охарактеризовали клетки, инкубированные с асцитами до и после химиотерапии, с помощью проточной цитометрии на поверхностные маркеры эпителиального (E-Cadherin) и мезенхимального (N-Cadherin) фенотипов. Как видно из рисунка 24В, асциты после химиотерапии значительно повышали экспрессию мезенхимального N-cadherin и понижали экспрессию эпителиального E-cadherin.

Кроме того, известно, что сплайсинговые факторы, идентифицированные в опухолевых асцитах после химиотерапии, могут индуцировать эпителиально-мезенхимальный переход, 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 [196, 200-202]. В связи с этим, мы проверили, могут ли асциты после химиотерапии, приводить к изменению альтернативного сплайсинга генов, которые задействованы в эпителиально-мезенхимальном переходе. Для этого, мы провели ПЦР анализ суммарной РНК из первичных культур клеток рака яичника, инкубированных в течение 3 дней с опухолевыми асцитами до и после терапии. 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 (Рисунок 24Г). Эти результаты демонстрируют, что опухолевые асциты после химиотерапии вносят значимый вклад в приобретение раковыми клетками более агрессивного фенотипа.

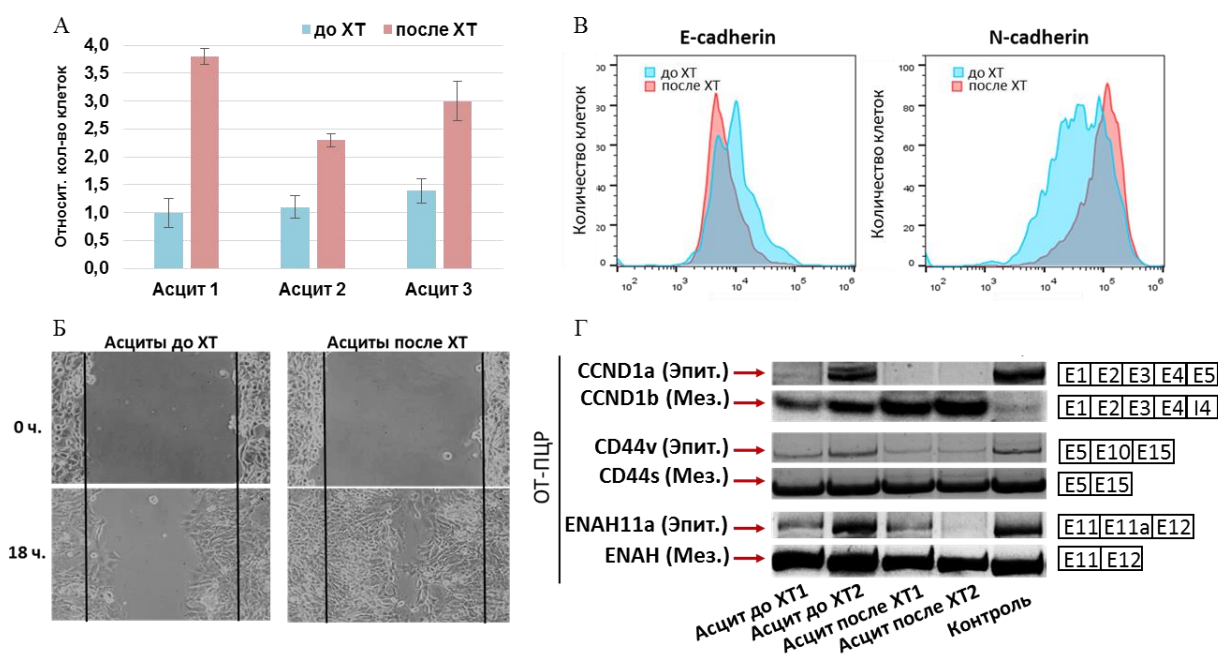


Рисунок 24 – А, Выживаемость первичных культур клеток рака яичника, прединкубированных с опухолевыми асцитами до и после химиотерапии и обработанных цисплатином. Представлено среднее значение МТТ-индекса относительно контрольных необработанных асцитами клеток \pm стандартное отклонение, рассчитанное по данным шести измерений. Б, Оценка подвижности первичных культур клеток рака яичника, инкубированных с опухолевыми асцитами до и после химиотерапии. В, Цитофлуориметрический анализ поверхностных маркеров E- и N-cadherin первичных культур клеток рака яичника, инкубированных с опухолевыми асцитами до и после химиотерапии. Г, ПЦР анализ сплайс-изоформ генов CCND1, CD44 и ENAH в первичных культурах клеток рака яичника, инкубированных с опухолевыми асцитами до и после химиотерапии; справа представлено схематичное изображение транскриптов, где указаны номера экзонов (E – экзон, I – интрон).

Чтобы выяснить, какая именно фракция асцитов приводит к формированию резистентных популяций опухолевых клеток, мы провели фракционирование асцита после химиотерапии с помощью картриджей для ультрафильтрации с отсечкой по молекулярной

массе 3 кДа, 10 кДа, 30 кДа и 100 кДа и исследовали влияние каждой фракции на выживаемость первичных культур клеток после действия цисплатина. Оказалось, что прединкубация клеток с фракцией асцита больше 100 кДа значительно повышает жизнеспособность клеток (Рисунок 25). Весьма любопытным оказался тот факт, что фракции асцитов менее 100 кДа, содержащие различные факторы роста (такие как TGFB1, TGFB2, FGF и др.) и цитокины, а также низкомолекулярные компонентами небелковой природы не вносили вклад в выживаемость опухолевых клеток. Результаты нашего исследования дали возможность по-новому взглянуть на секретом опухолевых клеток, так как ранее, по литературным данным, основную роль в прогрессии опухоли отводили низкомолекулярным митогенным сигналам и простагландину E2 [3, 4, 27, 203]. По нашим данным, наибольший вклад в возникновение резистентности опухолевых клеток вносит фракция асцитов, наиболее обогащенная мяРНК сплайсосомы (Рисунок 23Б). В связи с этим, мы впервые предположили, что эффект секретомов может частично обуславливаться наличием в них компонентов сплайсосомы.

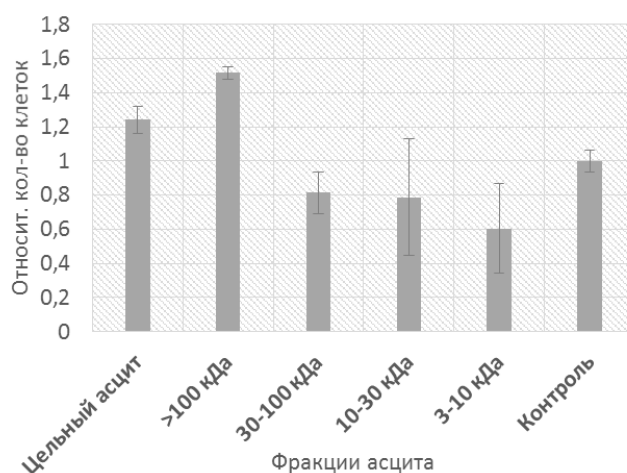


Рисунок 25 – Выживаемость первичных культур клеток рака яичника, прединкубированных с различными фракциями опухолевого асцита после химиотерапии (в течение 3 дней) и обработанных цисплатином (в течение 2 дней). Представлено среднее значение МТТ-индекса относительно контрольных необработанных асцитами клеток \pm стандартное отклонение, рассчитанное по данным шести измерений.

В результате первого этапа работы, мы впервые выяснили, что присутствие компонентов сплайсосомы характерно преимущественно для опухолевых асцитов, по сравнению с контрольными асцитами, полученными от пациенток с портальным алкогольным циррозом. Кроме того, нам удалось показать, что представленность компонентов сплайсосомы значительно повышается в асцитах после химиотерапии. Присутствие сплайсосомных белков и мяРНК в опухолевых образцах может отражать важную особенность раковых клеток, связанную с многочисленными нарушениями

процесса сплайсинга мРНК. Так, известно, что при опухолевой трансформации происходят значительные изменения экспрессии разнообразных факторов сплайсинга, значительно изменяются посттрансляционные модификации этих белков, а также возникают многочисленные мутации, существенно изменяющие активность этих белков [184, 185, 189, 204]. Мы идентифицировали большинство сплайсосомальных белков, для которых ранее была показана сверх-экспрессия в клетках рака яичника (Таблица 4) [205].

Таблица 4 – Гены, кодирующие белки сплайсосомного комплекса, для которых отмечена сверх-экспрессия [205] в опухолевых клетках.

Название гена	Идентифицировано в опухолевых асцитах	Идентифицировано в асцитах от пациенток с циррозом
<i>SNRNP70</i>	+	-
<i>U2AF1</i>	+	-
<i>U2AF2</i>	-	-
<i>SNRNP-A/A1</i>	+	-
<i>SNRNP-B/B1</i>	-	-
<i>SNRNP-C</i>	+	-
<i>SNRNP-D1</i>	+	+
<i>SNRNP-D2</i>	+	-
<i>SNRNP-D3</i>	+	-
<i>SNRNP-E</i>	+	-
<i>SNRNP-F</i>	+	-
<i>SNRNP-G</i>	+	-

Такой результат представляется особенно интересным в свете того, что в работе Quidville V. с коллегами было показано, что гипер-экспрессированный в опухолевых клетках Sm компонент сплайсосомы (в частности, SNRNP-E) участвует в регуляции PI3K/Akt/mTOR пути, часто нарушенного при раке яичника [205]. Таким образом, компоненты сплайсосомы могут служить привлекательными мишенями для противоопухолевой терапии.

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.

2.1 Протективный эффект секретомов, индуцированных химиотерапией, на реципиентные раковые клетки

Мы исследовали, может ли секретом от апоптотических раковых клеток защищать клетки от последующего действия химиопрепарата. Для этого мы инкубировали клетки рака яичника SKOV3 с кондиционными средами от опухолевых клеток, обработанных или не обработанных цисплатином. Кондиционированная среда отбиралась через разные временные промежутки после прединкубации с цисплатином (Рисунок 26). Концентрация цисплатина была подобрана таким образом, чтобы инкубация клеток с препаратом в течение 7 часов (с заменой среды на свежую, не содержащую этого препарата) вызывала гибель половины клеток через 24 часа. Такая методика позволяет добиться высокого уровня апоптоза в опухолевых клетках и при этом отбирать среду, не содержащую препарата, и исследовать дальнейшее действие этой среды на реципиентные клетки.

При исследовании эффекта от кондиционированной среды на реципиентные клетки мы показали, что прединкубация с 24- и 48-часовой кондиционными средами значительно повышала устойчивость клеток SKOV3 к последующему действию цисплатина (Рисунок 27). Наиболее сильным протективным эффектом обладал секретом, отобранный от раковых клеток через 48 ч. после добавления цисплатина. Кроме того, секретомы, индуцированные химиотерапией, также усиливали подвижность реципиентных раковых клеток (Рисунок 28).

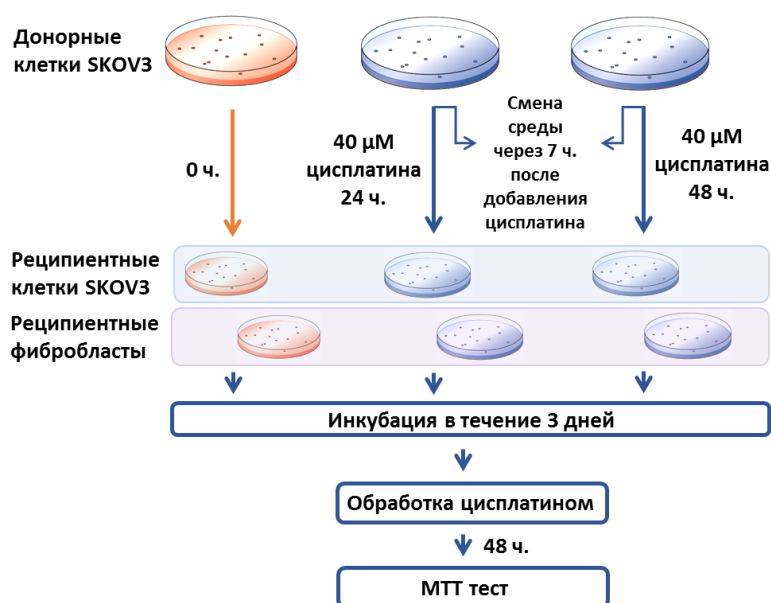


Рисунок 26 – Схема эксперимента для МТТ теста.

Следующим шагом, мы исследовали влияние секрета опухолевых клеток на первичную культуру нормальных тканей. Мы использовали МТТ тест, чтобы проверить, оказывают ли кондиционные среды от опухолевых клеток такой же протективный эффект на не опухолевые клетки. Выяснилось, что первичные фибробласты кожи, прединкубированные с кондиционными средами от опухолевых клеток, и затем подвергнутые обработке цисплатином (IC50) имели более низкую жизнеспособность и пролиферативную активность по сравнению с контрольными необработанными клетками (Рисунок 27). При этом индуцированные химиотерапией секретомы фибробластов также не оказывали защитного эффекта ни на раковые, ни на нормальные реципиентные клетки (данные не представлены). Таким образом, можно сделать вывод, что кондиционные среды от клеток SKOV3 действует лишь на опухолевые клетки, но не оказывают защитного эффекта на нормальные клетки.

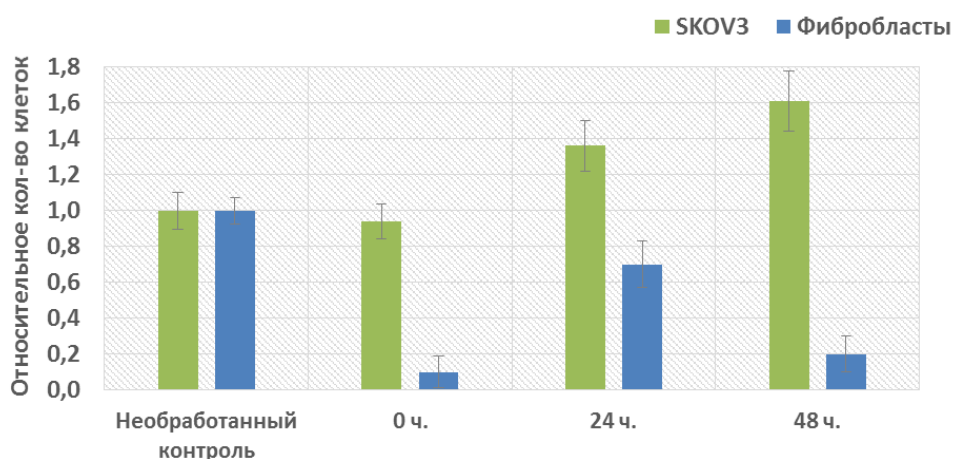


Рисунок 27 – Выживаемость реципиентных клеток SKOV3 и первичных культур фибробластов, прединкубированных в течение 3 дней с и без кондиционных сред (как указано на рис. 18) и обработанных цисплатином. Представлено среднее значение МТТ-индекса относительно контрольных необработанных кондиционными средами клеток \pm стандартное отклонение, рассчитанное по данным шести измерений.

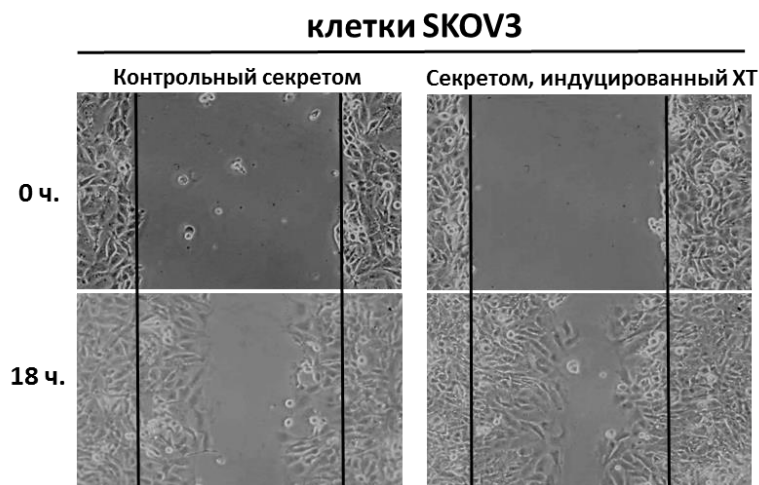


Рисунок 28 – Оценка подвижности клеток рака яичника SKOV3, инкубированных с контрольными секретомы и секретомы от апоптотических клеток.

Кроме того, мы также показали, что прединкубация клеток глиобластомы с секретомом от облученных клеток, также значительно повышала устойчивость к последующему действию ионизирующего излучения (Приложение 5).

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.

2.2 Протеомный анализ секретомов клеток после действия ХТ и ионизирующего излучения

Чтобы подтвердить полученные результаты на опухолевых асцитах до и после химиотерапии, мы исследовали, как изменяются секретомы опухолевых клеток *in vitro*. Для этого мы провели протеомный анализ кондиционных сред от клеток рака яичников SKOV3 до и после обработки цисплатином, и от первичных культур клеток глиобластомы до и после ионизирующего излучения (Рисунок 29).



Рисунок 29 – Схема подготовки секретомов, индуцированных химио- и радиотерапией, для протеомного анализа.

В протеомных исследованиях секретомов имеется две главные проблемы, затрудняющие анализ. Одна из них – это контаминация белками бычьей сыворотки, которая является необходимым компонентом культуральных сред. В то же время,

известно, что при удалении сыворотки из среды, клетки подвергаются сывороточному голоданию, которое приводит к клеточному стрессу, снижению жизнеспособности клеток и апоптозу [206]. Поэтому для снижения вероятности сывороточной контаминации, клетки перед заменой среды на бессывороточную несколько раз промывали раствором Хэнкса. Для того чтобы избежать эффектов, вызванных сывороточным голоданием, клетки инкубировали в бессывороточной среде не более 17 ч., в соответствии с работами, опубликованными ранее [57]. На момент окончания инкубации клеток SKOV3 жизнеспособность необработанных контрольных клеток была определена с помощью красителя трипанового синего и составляла $\geq 95\%$. Для клеток глиобластомы такой проблемы не было, поскольку эта культура велась в бессывороточной среде.

В отличие от биологических жидкостей, таких как асциты, сыворотка или плазма крови, секреты клеточных линий не содержат столь высокого динамического диапазона концентраций белков, поэтому мы проводили протеомный анализ без предварительных этапов фракционирования.

В секрете клеток SKOV3 через сутки после добавления цисплатина (в дозе IC50) было идентифицировано 2058 белков, а во внеклеточной среде необработанных контрольных клеток – 1065 белков (Рисунок 30А). В секретах контрольных интактных клеток глиобластомы было идентифицировано 304 белка, а через 24 ч. после облучения мы наблюдали 1075 белков (Рисунок 30Б). Наш анализ не предполагал деления культуральной среды на фракции, поэтому секреты включают белки, секретированные как классическим способом, так и посредством экзосом и микровезикул.

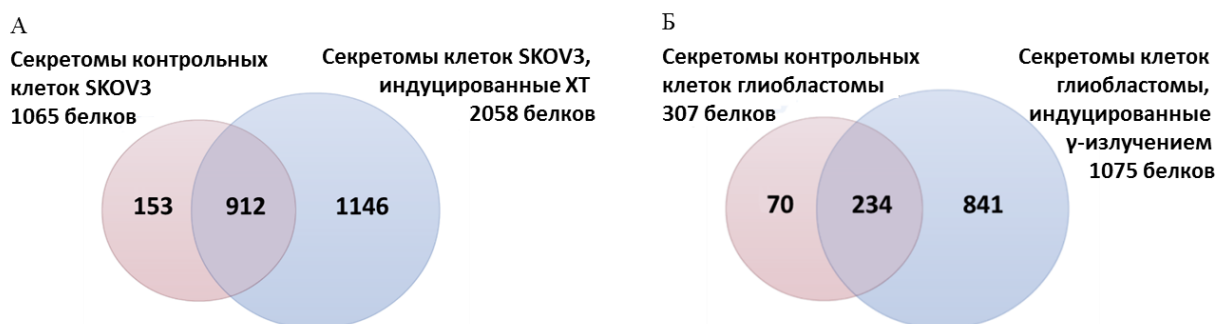


Рисунок 30 – Сравнительный анализ протеомов кондиционных сред от клеток SKOV3 (А) клеток глиобластомы (Б) до (розовая окружность) и после (синяя окружность) обработки цисплатином и ионизирующим излучением, соответственно.

При этом видно, что так же, как и для асцитов, в секретах после терапии мы всегда идентифицировали большее количество белков. Стоит отметить, что количество белка в секретах после обработки цисплатином в среднем увеличивалось в 1,4 раза. При этом, в контрольной группе и группе клеток, которые впоследствии подвергали обработке, количество клеток было одинаковым, а затем даже уменьшалось после

действия химиопрепарата. Эти данные указывают на то, что в условиях стресса опухолевые клетки в большей мере подвержены экзоцитозу, в результате чего протеомный состав индуцированных химиотерапией секретомов становится более разнообразным.

Чтобы найти изменения в представленности белков из секретомов клеток до и после химио- и радиотерапии, мы вновь использовали метод “total spectral count”, за значимые мы считали отличия в 4 раза. В секретоме клеток SKOV3 дифференциально представленными оказались 1708 белков, из которых 1504 белка были повышены в секретоме после химиотерапии. После воздействия ионизирующего излучения на клетки глиобластомы 998 белков оказались повышены относительно секретомы интактных клеток и 78 белков понижено.

2.3 Секретомы раковых клеток, индуцированные химио- и радиотерапией, обогащены компонентами сплайсосомы

Чтобы выяснить, в какие биологические процессы преимущественно вовлечены белки, появляющиеся в секретоме после терапии, мы использовали базы данных KEGG и Gene Ontology. Наиболее значимо в секретоме клеток SKOV3 после цисплатина понижалась представленность белков, вовлеченных в организацию внеклеточного матрикса и белков, отвечающих за деградацию макромолекул по лизосомному пути (Рисунок 31, верхняя панель).

Интересно, что среди дифференциально повышенных белков самые значимые отличия наблюдались для кластера белков сплайсосомы (Рисунок 31, нижняя панель; Рисунок 32) в секретоме обеих клеточных линий после действия цисплатина и ионизирующего излучения.

Суммарно, по данным KEGG и GO, в секретоме клеток SKOV3 после цисплатина нами было идентифицировано 138 белков, относящихся к процессу сплайсинга (Приложение 6), в секретоме клеток глиобластомы после действия ионизирующего излучения детектировалось 53 сплайсосомных белка. Среди них были как коровые белки, входящие в состав всех пяти рибонуклеопротеидов, так и регуляторы сплайсинга, относящиеся к семейству серин/аргинин богатых белков (serine/arginine-rich proteins, SR proteins), гетерогенных ядерных рибонуклеопротеинов (heterogeneous nuclear ribonucleoproteins, hnRNPs) и других РНК-связывающих белков.

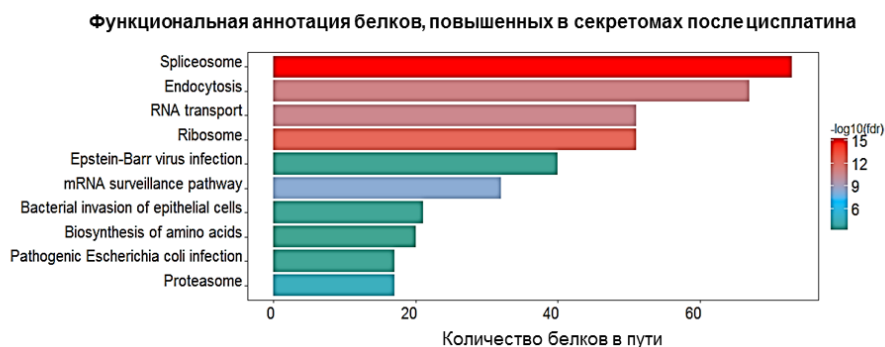
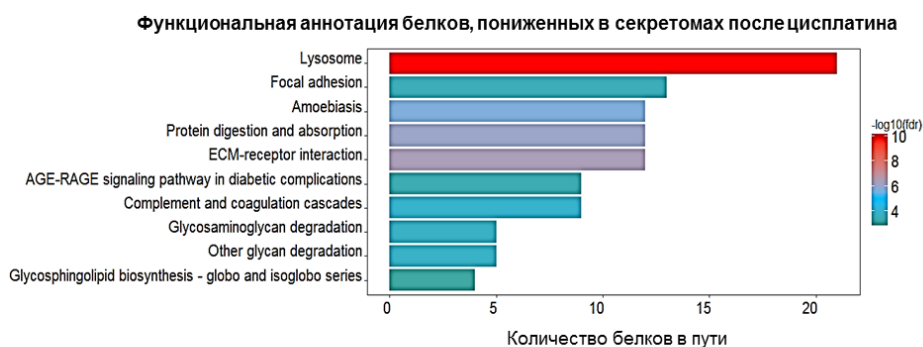


Рисунок 31 – Статистически значимые ($p < 0,05$) кластеры белков, дифференциально пониженных (верхняя панель) и повышенных (нижняя панель) в секретах клеток SKOV3 после действия цисплатина. Данные обогащения получены с использованием базы данных KEGG.

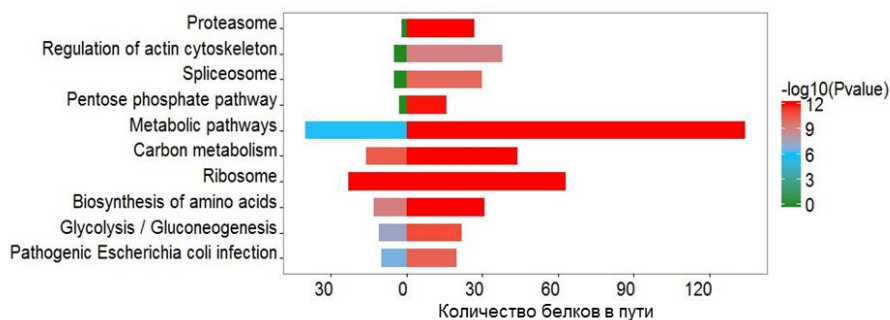


Рисунок 32 – Статистически значимые ($p < 0,05$) кластеры белков, дифференциально повышенных в секретах клеток глиобластомы после действия ионизирующего излучения. Данные обогащения получены с использованием базы данных KEGG.

Интересно, что, несмотря на различные клеточные системы (*in vitro* и *in vivo*) и различные схемы химиотерапии, мы обнаружили значительное перекрытие между секретами клеток рака яичника SKOV3 и внеклеточной частью асцитов при раке яичника. Общие повышенные после химиотерапии белки (304 белка) относились преимущественно к кластерам белков сплайсосомы, протеасомы и рибосомы. (Приложение 7). Эти данные указывают на то, что секреты от регрессирующих опухолей являются ответной реакцией на химиотерапию и содержат схожие секретлируемые факторы, которые способны стимулировать раковые клетки.

Кроме того, количественная ОТ-ПЦР показала повышенные уровни всех сплайсосомных мРНК в секретах клеток SKOV3 после химиотерапии (Рисунок 33).

Причем, нами были проанализированы отдельно фракции микровезикул, экзосом и супернатанта. Видно, что мяРНК детектировались во всех фракциях, что согласуется с данными, полученными на асцитах (Рисунок 23А). Мы также проанализировали наличие всех 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 (Рисунок 34).

Важно, что протеомные данные и данные ПЦР анализа для двух совершенно разных клеточных линий согласуются с нашими результатами для асцитных жидкостей, которые после химиотерапии также были обогащены сплайсосомными белками и мяРНК (Рисунок 20, 21).

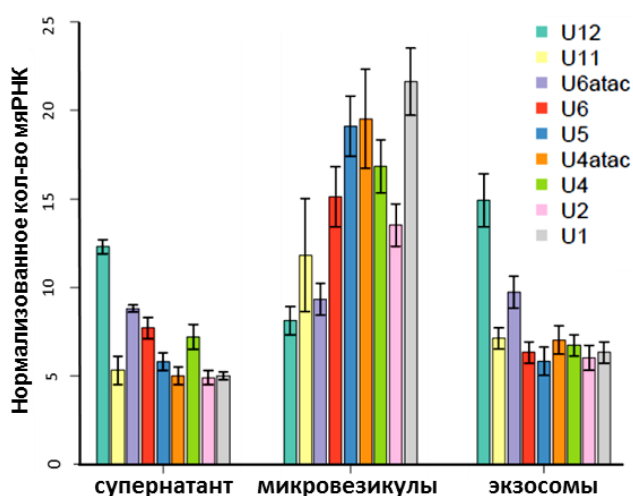


Рисунок 33 – данные ОТ-ПЦР анализа мяРНК в различных фракциях секретов клеток SKOV3 после действия цисплатина относительно контрольных необработанных клеток. Полученные данные были нормализованы на искусственно синтезированный стандарт – фрагмент GFP89.

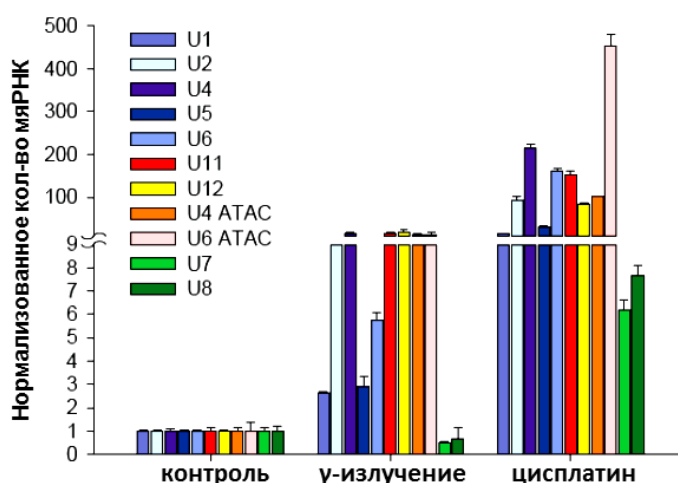


Рисунок 34– данные ОТ-ПЦР анализа мяРНК во внеклеточных везикулах (микровезикулы + экзосомы), выделенных из секретов клеток глиобластомы после действия ионизирующего излучения или цисплатина. Полученные данные были нормализованы по 18S рРНК, GAPDH или количеству totalной РНК, все типы нормализации дали схожие результаты.

2.4 Влияние химиотерапии на секрецию неонкотрансформированных клеток

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 человеческих дермальных фибробластов до и через 24 ч. после обработки цисплатином (IC50) (Рисунок 29). Причем стоит отметить, что доза IC50 для дермальных фибробластов была в два раза выше по сравнению с клетками рака яичника SKOV3.

LC-MS/MS анализ секретомов раковых клеток и фибробластов после действия химиотерапии показал различные протеомные профили (Рисунок 35). При нормальных условиях примерно половина белков в секретоме фибробластов и раковых клеток пересекаются. При этом имеется ряд уникальных белков. Так, например, в секретоме фибробластов высоко представлены коллагены и различные изоформы фибронектина. Обогащение по базам данных метаболических путей показало в секретоме фибробластов большую представленность белков клеточной адгезии и внеклеточного матрикса; белков, относящихся к лизосоме и процессу заживления раны, а также к клеточной миграции.

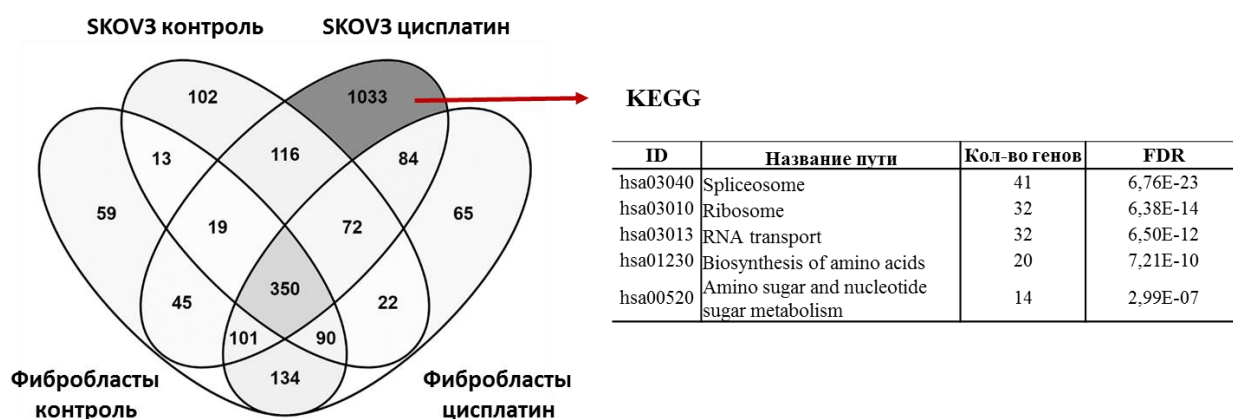


Рисунок 35 – Сравнительный анализ секретомов клеток рака яичника SKOV3 и фибробластов до и после обработки цисплатином. Функциональная аннотация белков, секретируемых клетками SKOV3 в ответ на химиотерапию.

В свою очередь, для секретомов раковых клеток в сравнении с фибробластами, при нормальных условиях характерно повышение представленности белков протеасомы; появляется большое количество белков, обладающих различными протеолитическими функциями, а также ферментов, принимающих участие в деградации/синтезе липидных компонентов. Кроме того, клетки SKOV3 секретируют ряд уникальных белков (белок FAM3C; гранулины, GRN; фактор роста/дифференцировки 15, GDF15), которые играют роль в процессе воспаления и ремоделирования ткани (Таблица 5). Интересно, что

представленность этих белков резко падает в секретах раковых клеток после воздействия цисплатином, однако, при этом, фибробласты начинают секретировать эти белки исключительно после обработки химиопрепаратом (Таблица 5). Раковые клетки также активно секретируют белок альфа, регулирующий рост CXCL1, который вовлечен в клеточную пролиферацию. Представленность данного белка в раковых секретах после цисплатина падает в 6 раз, при этом фибробласты секретируют его на низком уровне, и сигнал не меняется на фоне химиотерапии.

После обработки цисплатином понижается секреция раковыми клетками эфринов EFNA5 и EFNB2, которые являются лигандами для поверхностного тирозин-киназного рецептора (Таблица 5). Сверхэкспрессия белков этого семейства ассоциирована с плохим прогнозом и прогрессией рака молочной железы, рака легкого, а также рака яичника [207]. В секретах фибробластов белки этого семейства не были детектированы.

Таблица 5 – Опухоль-ассоциированные белки, идентифицированные в нашем протеомном исследовании в секретах клеток рака яичника SKOV3 и фибробластов до и после обработки цисплатином.

Название гена	Название белка	Mv	Количество спектров на белок			
			Секреты фибробластов		Секреты клеток SKOV3	
			Контроль	Цисплатин	Контроль	Цисплатин
FAM3C	Protein FAM3C	25 кДа	0	3	36	6
GRN	Granulins	64 кДа	0	3	16	0
GDF15	Growth/differentiation factor 15	34 кДа	0	26	10	2
CXCL1	Growth-regulated alpha protein	11 кДа	1	2	52	9
EFNA5	Ephrin-A5	26 кДа	0	0	8	1
EFNB2	Ephrin-B2	37 кДа	0	0	1	0
TGFB1	Transforming growth factor beta-1	44 кДа	1	5	14	1
TGFB2	Transforming growth factor beta-2	48 кДа	0	0	4	0
MET	Hepatocyte growth factor receptor	156 кДа	0	0	2	3
IGF2	Insulin-like growth factor 2	8 кДа	0	0	1	0
VEGFB	Vascular endothelial growth factor B	22 кДа	0	0	1	0
VEGFC	Vascular endothelial growth factor C	47 кДа	2	3	10	0
LOXL2	Lysyl oxidase homolog 2	87 кДа	2	2	27	0
BMP1	Bone morphogenetic protein 1	111 кДа	1	2	4	0
CSF1	Macrophage colony-stimulating factor 1	60 кДа	30	54	90	14
FSTL1	Follistatin-related protein 1	35 кДа	14	66	147	7
CYR61	Protein CYR61	42 кДа	1	1	14	6
MYDGF	Myeloid-derived growth factor	19 кДа	6	10	12	9
EFEMP1	EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1	55 кДа	3	0	6	0
CTGF	Connective tissue growth factor	38 кДа	0	6	1	0

Особенно интересным оказался тот факт, что большинство известных факторов роста и сигнальных молекул присутствуют либо исключительно в секретах раковых клеток при нормальных условиях, либо значительно понижаются в представленности после обработки цисплатином. При этом, некоторые из этих факторов начинают секретироваться фибробластами только после действия цисплатина.

Так, например, трансформирующий фактор роста TGFB2, инсулиноподобный фактор роста IGF2, факторы роста эндотелия сосудов VEGFB и VEGFC; EFEMP1, регулирующий клеточную миграцию, а также лизилоксидаза LOXL2, участвующая в ангиогенезе в случае внеклеточной локализации, и белок BMP1, участвующий в активации лизилоксидазы, присутствуют в секретах раковых клеток, но после действия цисплатина не детектируются (Таблица 5).

Представленность следующей группы белков, таких как трансформирующий фактор роста TGFB1; белки FSTL1, MYDGF и CYR61, вовлеченные в клеточную пролиферацию и миграцию, а также активацию ангиогенеза; колониестимулирующий фактор CSF1, усиливающий высвобождение провоспалительных цитокинов, – значительно падает в секретах раковых клеток после действия цисплатина. Однако фибробласты, наоборот, начинают секретировать большинство этих белков в стрессовых условиях (Таблица 5).

Кроме того, на рисунке 35 хорошо видно, что после воздействия химиопрепарата, репертуар белков, секретлируемых раковыми клетками, становится разнообразнее и значительно отличается от секретомов фибробластов. После обогащения по базам данных метаболических путей, в секретах раковых клеток после химиотерапии наиболее значимо отличались белки, относящиеся к процессу сплайсинга (Рисунок 35). В секретах фибробластов также были идентифицированы белки сплайсосомы, но их представленность была незначительна (Таблица 6).

Таблица 6 – Сплайсосомальные белки, идентифицированные в нашем протеомном исследовании в секретах клеток рака яичника SKOV3 и фибробластов до и после обработки цисплатином.

Название гена	Название белка	Mw	Количество спектров на белок			
			Секреты фибробластов		Секреты клеток SKOV3	
			Контроль	Цисплатин	Контроль	Цисплатин
ALYREF	TPO complex subunit 4	27 kDa	5	2	1	15
BUD31	Protein BUD31 homolog	17 kDa	0	0	0	1

Продолжение Таблицы 6

CDC5L	Cell division cycle 5-like protein	92 kDa	0	0	0	2
CHERP	Calcium homeostasis endoplasmic reticulum protein	103 kDa	0	0	0	4
DDX39B	Spliceosome RNA helicase	49 kDa	0	1	2	63
DDX42	ATP-dependent RNA helicase	103 kDa	0	0	0	2
DDX46	Probable ATP-dependent RNA helicase	117 kDa	0	1	0	2
DHX15	Pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA helicase DHX15	91 kDa	0	0	0	2
DHX38	Pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA helicase PRP16	141 kDa	0	0	0	3
EFTUD2	116 kDa U5 small nuclear ribonucleoprotein component	109 kDa	0	0	0	8
EIF4A3	Eukaryotic initiation factor 4A-III	47 kDa	0	0	2	21
HNRNPA1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	39 kDa	15	15	21	145
HNRNPA2B1	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	37 kDa	19	19	18	137
HNRNPA3	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3	40 kDa	0	0	0	6
HNRNPC	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2	34 kDa	7	11	9	35
HNRNPD	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0 (Fragment)	13 kDa	0	0	0	12
HNRNPDL	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like	46 kDa	0	3	0	14
HNRNPF	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F	46 kDa	3	4	5	28
HNRNPH1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H	49 kDa	2	4	0	26
HNRNPH2	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H2	49 kDa	0	0	0	7
HNRNPK	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	51 kDa	11	1	5	103
HNRNPL	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L	64 kDa	1	2	2	41
HNRNPM	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M	78 kDa	2	3	0	42
HNRNPR	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R	71 kDa	2	4	1	57
HNRNPU	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U	91 kDa	0	2	3	26
HNRNPUL2	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like protein 2	85 kDa	0	0	1	22
HSPA1A	Heat shock 70 kDa protein 1A	70 kDa	2	16	15	121

Продолжение Таблицы 6

HSPA2	Heat shock-related 70 kDa protein 2	70 kDa	0	0	0	55
HSPA8	Heat shock cognate 71 kDa	71 kDa	40	61	33	259
LSM3	U6 мяРНК-associated Sm-like protein LSm3	12 kDa	0	0	0	3
LSM4	U6 мяРНК-associated Sm-like protein LSm4	15 kDa	0	0	0	1
LSM5	U6 мяРНК-associated Sm-like protein LSm5	10 kDa	1	0	0	8
LSM7	U6 мяРНК-associated Sm-like protein LSm7	12 kDa	0	0	0	1
LSM8	U6 мяРНК-associated Sm-like protein LSm8	10 kDa	0	0	0	3
MAGOH	Protein mago nashi homolog	17 kDa	0	0	0	11
NCBP1	Nuclear cap-binding protein subunit 1	92 kDa	0	0	0	3
PCBP1	Poly(rC)-binding protein 1	37 kDa	6	2	2	42
PHF5A	PHD finger-like domain-containing protein 5A	12 kDa	0	0	0	1
PLRG1	Pleiotropic regulator 1	57 kDa	0	0	0	1
PPIE	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase E	33 kDa	0	0	0	1
PPIH	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase H	19 kDa	0	0	0	13
PPIL1	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase-like 1	18 kDa	0	0	0	8
PRPF19	Pre-mRNA-processing factor 19	55 kDa	0	0	0	11
PRPF4	U4/U6 small nuclear ribonucleoprotein Prp4	58 kDa	0	0	0	1
PUF60	Poly(U)-binding-splicing factor PUF60	60 kDa	0	1	1	41
RALY	RNA binding protein (Autoantigenic, hnRNP-associated with lethal yellow) long isoform variant (Fragment)	33 kDa	0	0	0	2
RBM22	Pre-mRNA-splicing factor RBM22	47 kDa	0	0	0	2
RBM25	RNA-binding protein 25	100 kDa	0	0	0	2
RBM3	RNA-binding protein 3	17 kDa	1	3	2	51
RBM8A	RNA-binding protein 8A	20 kDa	0	0	0	9
RBM10	Isoform 2 of RNA-binding protein 10	103 kDa	0	0	0	4
RBM14	RNA-binding protein 14	69 kDa	0	0	0	1
RBMX	RNA-binding motif protein, X chromosome	42 kDa	2	1	0	13

Продолжение Таблицы 6

RBM39	RNA-binding protein 39	59 kDa	0	0	0	11
RBM42	RNA-binding protein 42	50 kDa	0	0	0	1
SF1	Splicing factor 1	68 kDa	1	3	0	26
SF3A1	Splicing factor 3A subunit 1	89 kDa	1	0	1	23
SF3A2	SF3A2 protein (Fragment)	51 kDa	0	0	0	23
SF3A3	Splicing factor 3A subunit 3	59 kDa	0	0	0	11
SF3B2	Splicing factor 3B subunit 2	100 kDa	0	1	0	4
SF3B3	Splicing factor 3B subunit 3	136 kDa	0	0	0	5
SF3B4	Splicing factor 3B subunit 4	44 kDa	0	1	0	17
SFPQ	Splicing factor, proline- and glutamine-rich	76 kDa	6	2	5	43
SNRPA	U1 small nuclear ribonucleoprotein A	31 kDa	0	0	0	6
SNRPB	Small nuclear ribonucleoprotein-associated proteins B and B'	25 kDa	0	0	0	7
SNRPB2	U2 small nuclear ribonucleoprotein B''	25 kDa	0	0	0	2
SNRPD1	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D1	13 kDa	0	1	2	12
SNRPD2	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D2	14 kDa	0	0	0	1
SNRPD3	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D3	14 kDa	0	0	0	10
SNRPE	Small nuclear ribonucleoprotein E	11 kDa	0	0	0	18
SNRPG	Small nuclear ribonucleoprotein G	8 kDa	0	2	2	10
SNU13	NHP2-like protein 1	14 kDa	0	0	0	6
SNW1	SNW domain-containing protein 1	65 kDa	0	0	0	1
SRSF1	Serine/arginine-rich splicing factor 1	28 kDa	0	0	0	4
SRSF3	Serine/arginine-rich splicing factor 3	19 kDa	0	0	0	2
SRSF7	Serine/arginine-rich splicing factor 7	27 kDa	0	0	0	2
SRSF11	Serine/arginine-rich splicing factor 11	54 kDa	0	0	0	2
TCERG1	Transcription elongation regulator 1	124 kDa	0	0	0	3
TRA2B	Transformer-2 protein homolog beta	34 kDa	0	0	0	2

Продолжение Таблицы 6

TXNL4A	Thioredoxin-like protein 4A	17 kDa	0	0	0	6
U2AF2	Splicing factor U2AF 65 kDa subunit	54 kDa	2	5	6	54
U2SURP	U2 snRNP-associated SURP motif-containing protein	118 kDa	0	0	0	1
USP39	U4/U6.U5 tri-snRNP-associated protein 2	65 kDa	0	0	0	2
YBX1	Nuclease-sensitive element-binding protein 1	36 kDa	2	6	4	20

Мы выяснили, что гибель нормальных фибробластов вызывает гораздо большая доза цисплатина и обнаружили, что секреция сплайсосомных белков после воздействия химиопрепарата характерна преимущественно для раковых клеток. Кроме того, данные ОТ-ПЦР показали, что мРНК отсутствовали в секретах фибробластов как до, так и после обработки цисплатином (данные не представлены).

2.5 Изменения субклеточного протеома, индуцированные повреждением ДНК

Суммируя приведенные выше данные, видно, что во всех исследованных раковых секретах 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 (по 200 мкг) экстрактов ядерной и цитоплазматической фракций, а также тотального клеточного лизата (Рисунок 36).

Для валидации качества разделения ядерной фракции от цитоплазматической, была проведен аналитический электрофорез, а также с помощью масс-спектрометрии была оценена представленность распределения белков, часто используемых в качестве маркеров цитоплазматической (tubulin-alpha-1A) и ядерной (lamin B1 and RPA194) фракций.

В целом, было идентифицировано 4085 белков. Дифференциально представленными считали белки, отличающиеся в 2 и более раз. Таким образом, в ядерной фракции представленность 442 белков была повышена и 578 белков – понижена после обработки цисплатином. Как и ожидалось, мы обнаружили, что при индукции апоптоза

количество сплайсосомных белков снижается в ядре и увеличивается в цитоплазме (Рисунок 37). 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 (Рисунок 37).

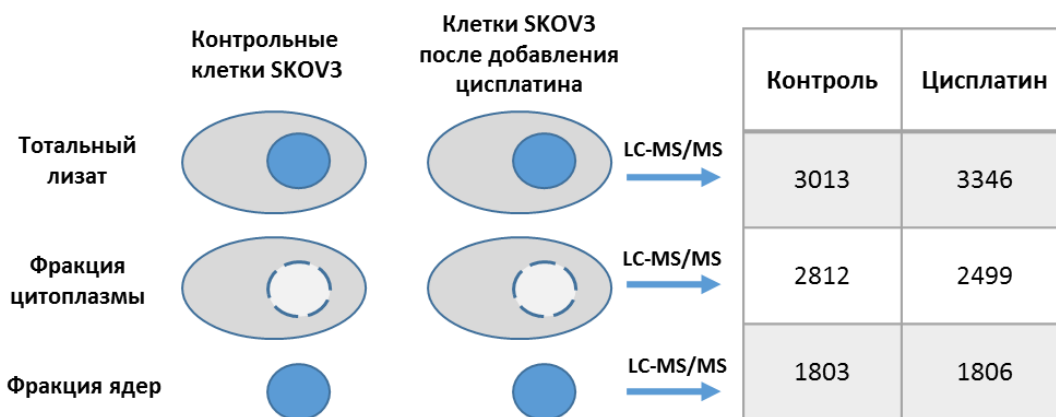


Рисунок 36 – Схема субклеточного протеомного анализа клеток рака яичника SKOV3 до и после обработки цисплатином (IC50). Показано количество идентифицированных белков в ядрах, цитоплазме и тотальном лизате до и после обработки химиопрепаратом. А также приведена диаграмма Венна, показывающая распределение белков, идентифицированных в клетках и в секретоматх от этих же клеток.

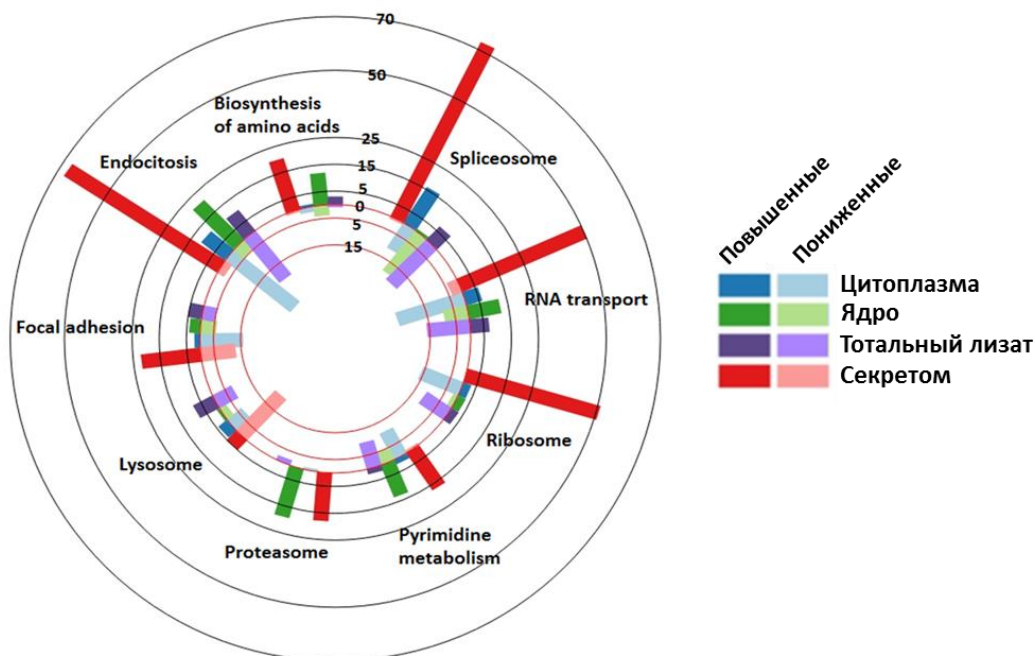


Рисунок 37 – круговая диаграмма, показывающая основные метаболические пути, в которые вовлечены дифференциально повышенные и пониженные белки, для фракций ядер, цитоплазмы, тотальных лизатов и секретоматов этих же клеток SKOV3 после обработки цисплатином относительно контрольных необработанных клеток и их секретоматов.

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 [208, 209]. Смена локализации может быть потенциальной причиной обнаружения этих ядерных белков во внеклеточной среде.

3 Выявление роли компонентов сплайсосомы в межклеточной коммуникации раковых новообразований

3.1 Сплайсосомные белки и некоторые типы РНК, оказываясь во внеклеточной среде, могут поглощаться реципиентными клетками

Мы показали, что секретомы раковых клеток после химиотерапии [8] и ионизирующего излучения [2] обогащены компонентами сплайсосомы: а именно сплайсосомными белками и всеми типами малых ядерных РНК, относящихся к минорной и мажорной сплайсосомам. Кроме того, мы выяснили, что в результате действия цисплатина, сплайсосомные белки понижаются в представленности в ядерной фракции и повышаются в цитоплазматической. 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 (см. главу II. Экспериментальная часть). 5-этинил уридин свободно проникает внутрь клеток и включается в состав вновь синтезированных молекул РНК. На следующий день, после добавления меченого уридина, клетки глиобластомы были облучены дозой ионизирующего излучения 12 Гр и через 48 часов из среды были выделены везикулы, секретированные этими клетками. Везикулы тщательно промывались большим объёмом буфера PBS, чтобы избавиться от не связавшейся метки. Выделенные везикулы были добавлены к реципиентным клеткам глиобластомы и через 24 часа клетки были фиксированы, а экзогенные молекулы РНК, попавшие внутрь клеток из везикул, были окрашены азидом Alexa 488 (метод азид-алкинового циклоприсоединения). Такой метод позволил окрасить экзогенные молекулы, меченные 5-этинил уридином, но не эндогенные, не меченные молекулы РНК. В дополнение к окрашиванию РНК мы также окрасили белок сплайсосомы SF3A3 методом иммуноцитохимии. По данным конфокальной микроскопии (Рисунок 38), 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 даже в ядрышках реципиентных клеток.

Это может говорить о том, что таким образом могут переноситься как малые ядерные РНК, так и малые ядрышковые РНК. Кроме того, имеются независимые данные о наличии в крови онкологических пациентов как в свободной форме, так и в составе мембранных везикул циркулирующих фрагментов и полноразмерных форм различных классов некодирующих РНК (нкРНК), среди которых можно выделить представителей классов мяоРНК и мяРНК [210-213].



Рисунок 38 – 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. Для окрашивания клеточной мембраны использовали антитела к CD44. Масштаб: 20 мкм.

3.2 Выявление роли внеклеточных сплайсосомальных мяРНК в межклеточной коммуникации злокачественных новообразований

В настоящее время вопрос о функциях внеклеточных форм нкРНК остается открытым. Кроме того, нерешенными являются вопросы о транспорте таких РНК из ядра в цитоплазму и во внеклеточное пространство, и об их участии во внутриклеточных процессах при проникновении в клетки-реципиенты. 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 Ubatas.

Для выявления биологических процессов, в которых могут быть задействованы выбранные мяРНК был выбран подход синтеза их искусственных аналогов и последующей трансфекции таких РНК-конструкций в раковые клетки человека.

Во-первых, необходимо было разработать эффективную схему синтеза РНК, минимизирующую деградацию продукта. Во-вторых, экзогенные одноцепочечные РНК

активируют неспецифический иммунный ответ клеток через интерфероновый и NF-κB-зависимый пути [214]. Известно, что включение модифицированных мономеров в структуру РНК позволяет снизить противовирусный ответ [215], в связи с чем отдельный этап работы был посвящен выбору успешной комбинации и глубины модификации РНК-конструкций. После чего, предстояло подобрать оптимальные, нетоксичные для реципиентных клеток концентрации мРНК и способ эффективной трансфекции, а также оценить эффективность накопления, стабильность и локализацию синтетических РНК-конструкций в клетках. Следующий этап работы предполагал поиск функциональной активности полученных РНК-конструкций, что было достигнуто методами транскриптного секвенирования и протеомного профилирования.

3.2.1 Разработка схемы синтеза *in vitro* РНК-конструкций, несущих последовательности нескольких мРНК

Нами были сконструированы олигодезоксирибонуклеотидные матрицы и праймеры, содержащие промотор РНК-полимеразы фага Т7, и получены искусственные аналоги мРНК: U12 и Ubatac, а также фрагмент РНК зеленого флуоресцентного белка (green fluorescent protein, GFP) в качестве неспецифического контроля (Таблица 7). Для синтеза аналогов U12 и Ubatac мРНК ДНК-матрицы получали в реакции ОТ-ПЦР суммарной РНК клеток MCF-7 со специфическими праймерами.

Таблица 7 – Последовательности аналогов малых нкРНК

Обозначение аналога мРНК	Последовательность 5'→3' (длина, нк)
Ubatac	GUGUUGUAUGAAAGGAGAGAAGGUUAGCACUCCCCUUGACAAGGAU GGAAGAGGCCUCGGGCCUGACAACACGCAUACGGUUAAGGCAUUGC CACCUACUUCGUGGCAUCUAACCAUCGUUUUU (125 нк)
U12	GAUGCCUAAAACUUAUGAGUAAGGAAAAUAACGAUUCGGGGUGACG CCCGAAUCCUCACUGCUAAUGUGAGACGAAUUUUUGAGCGGGUAAA GGUCGCCUCAAGGUGACCCGCCUACUUUGCGGGAUGCCUGGGAGUU GCGAUCUGCCCG (150 нк)
GFP-89	ACGTGCACGGCCACAAGTTCAGCGTGC GCGGCGAGGGCGAGGGCGAC GCCGACTACGGCAAGCTGGAGATCAAGTTCATCTGCACCACC (89 нк)

Статистическое включение в структуру аналогов мРНК неканонических мономеров: псевдоуридина (Ψ), 5-метил-цитидина (m5C) и N6-метиладенозина (m6A) проводили на стадии транскрипции *in vitro*. Транскрипты, полученные *in vitro* с использованием РНК-полимеразы фага Т7, содержат на 5'-конце трифосфат. Известно, что такая структура в составе искусственных РНК является фактором, активирующим

неспецифический иммунный ответ в клетках человека, что значительно затрудняет анализ специфического действия аналогов природных РНК. В составе природных форм мкРНК на 5'-конце присутствует остаток монофосфата или структура кэпа [216]. Для формирования остатка монофосфата на 5'-конце синтезированные аналоги малых мкРНК обрабатывали последовательно щелочной фосфатазой и полинуклеотидкиназой фага Т4. Для очистки продуктов транскрипции от компонентов реакционной смеси была предложена схема, минимизирующая неспецифическую деградацию РНК. Схема включала следующие этапы:

- *in vitro* синтез РНК-конструкций на основе ДНК матриц;
- гель-фильтрация (для избавления от неспецифических продуктов синтеза);
- обработка полученных транскриптов ДНКазой и щелочной фосфатазой;
- фенол-хлороформная экстракция (для инактивации ферментов с предыдущей стадии);
- обработка полинуклеотидкиназой фага Т4;
- финальная препаративная ВЭЖХ.

По сравнению со стандартным подходом, предложенный протокол обеспечивал высокий уровень сохранности и больший выход конечного продукта (сравнение приведено на Рисунке 39).

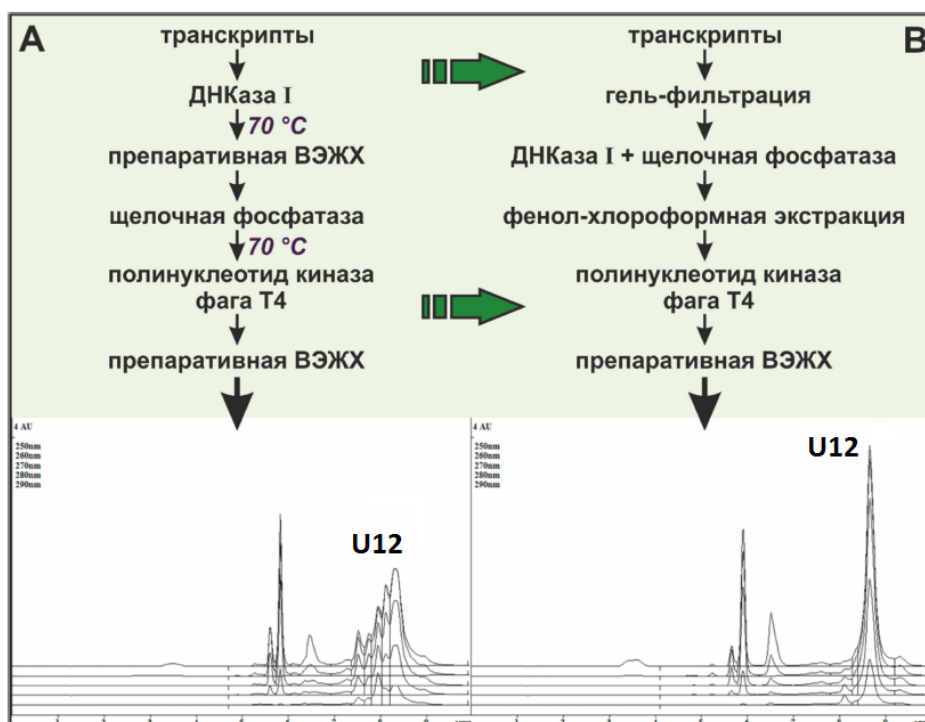


Рисунок 39 – Сравнение двух альтернативных методик инактивации ферментов и очистки продуктов транскрипции от компонентов реакционных смесей. На верхней панели представлена последовательность стадий используемых методик. На нижней панели приведены результаты финальных препаративных хроматографий.

3.2.2 Предотвращение активации неспецифического иммунного ответа в трансфицированных клетках

Известно, что трансфекция клеток одноцепочечными РНК приводит к повышению уровня транскрипции группы генов интерферонового ответа. Каскад врожденного иммунного ответа при длительном воздействии стимулирующего агента может активировать проапоптотические процессы в клетках. Такой неспецифический эффект зачастую сопровождается повышенной нежелательной цитотоксичностью синтетических РНК, что приводит к существенному изменению профиля экспрессии генов в клетках человека и затрудняет анализ специфических путей функционирования РНК.

В то же время, уже получены данные о том, что включение модифицированных мономеров в структуру синтетических РНК позволяет снизить активацию врожденного иммунного ответа клеток человека [215].

Нами также было показано, что включение ряда неканонических нуклеотидов (псевдоуридина (Ψ), 5-метил-цитидина (m5C), N6-метиладенозина (m6A)) в состав аналогов мРНК снижает иммуностимулирующую активность синтетических РНК даже в присутствии 5'-трифосфата в составе РНК как индуктора интерферонового ответа (Рисунок 40).

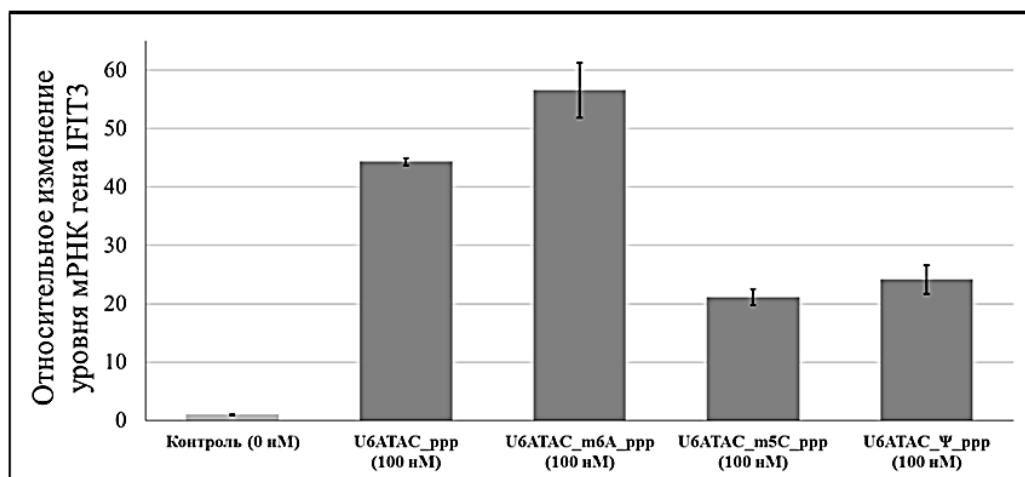


Рисунок 40 – Диаграмма уровня мРНК гена IFIT3 в клетках MCF-7, трансфицированных аналогами U6atas мРНК, имеющими в своей последовательности неканонические нуклеозиды m6A, m5C и Ψ, и немодифицированными аналогами. Представлено среднее значение изменения уровня мРНК IFIT3 относительно контрольных клеток с указанием стандартного отклонения, рассчитанного по данным трех независимых экспериментов. (ppp - 5'-трифосфат в составе РНК)

Для оценки активации неспецифического иммунного ответа в клетках, трансфицированных аналогами малых нкРНК, были выбран ген IFIT3, как один из

быстро-активируемых интерферон-зависимых и проапоптотических генов клеток человека. В качестве тестовых культур использовали клетки аденокарциномы молочной железы MCF7 и карциномы яичника SKOV3. Введение в структуру синтетических РНК кэпа: моно-(m^3G) или триметилированного ($m_3^{2,2,7}G$) гуанозина для аналогов U6atac и U12 мяРНК, соответственно, – также способствовало снижению индукции иммунной системы клеток аналогами мяРНК (Рисунок 41).

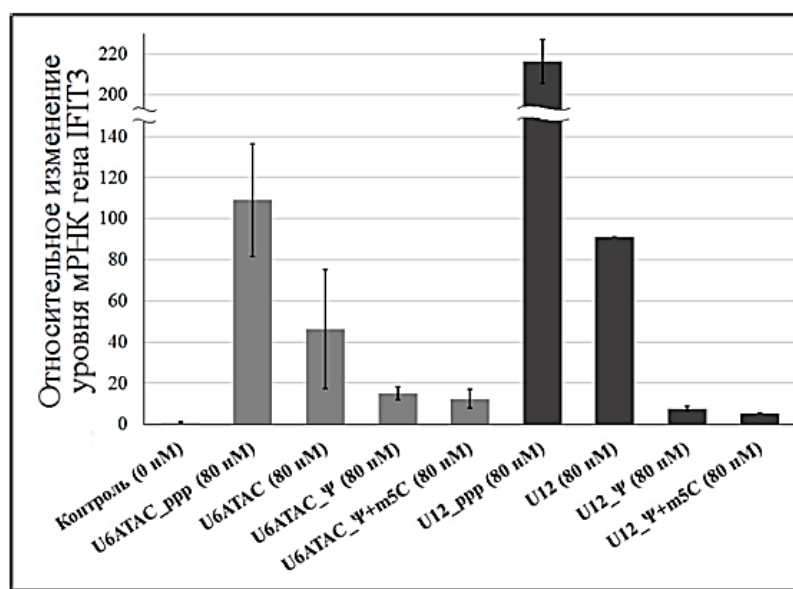


Рисунок 41 – Диаграмма уровня мРНК гена IFIT3 в клетках MCF-7, трансфицированных синтетическими аналогами мяРНК, содержащими неканонические нуклеотиды m5C и Ψ и структуры кэпа на 5'-конце, по сравнению с немодифицированными аналогами, содержащими 5'-трифосфат (U6atac_ppp и U12_ppp). Представлено среднее значение изменения уровня мРНК IFIT3 относительно контрольных клеток с указанием стандартного отклонения, рассчитанного по данным трех независимых экспериментов.

При анализе активации генов иммунного ответа в трансфицированных клетках SKOV3 было обнаружено лишь незначительное повышение уровня мРНК гена IFIT3 (в 2-6 раз). Для подтверждения низкого уровня активации врожденного иммунного ответа в клетках SKOV3 полученными аналогами мяРНК была проведена оценка уровня активации генов IFIT1 и PKR (Рисунок 42). Наибольшего снижения иммуностимулирующей активности синтетических РНК удается достичь при использовании модификации их структуры с применением мономеров псевдоуридина и 5-метилцитидина на обеих анализируемых культурах клеток.

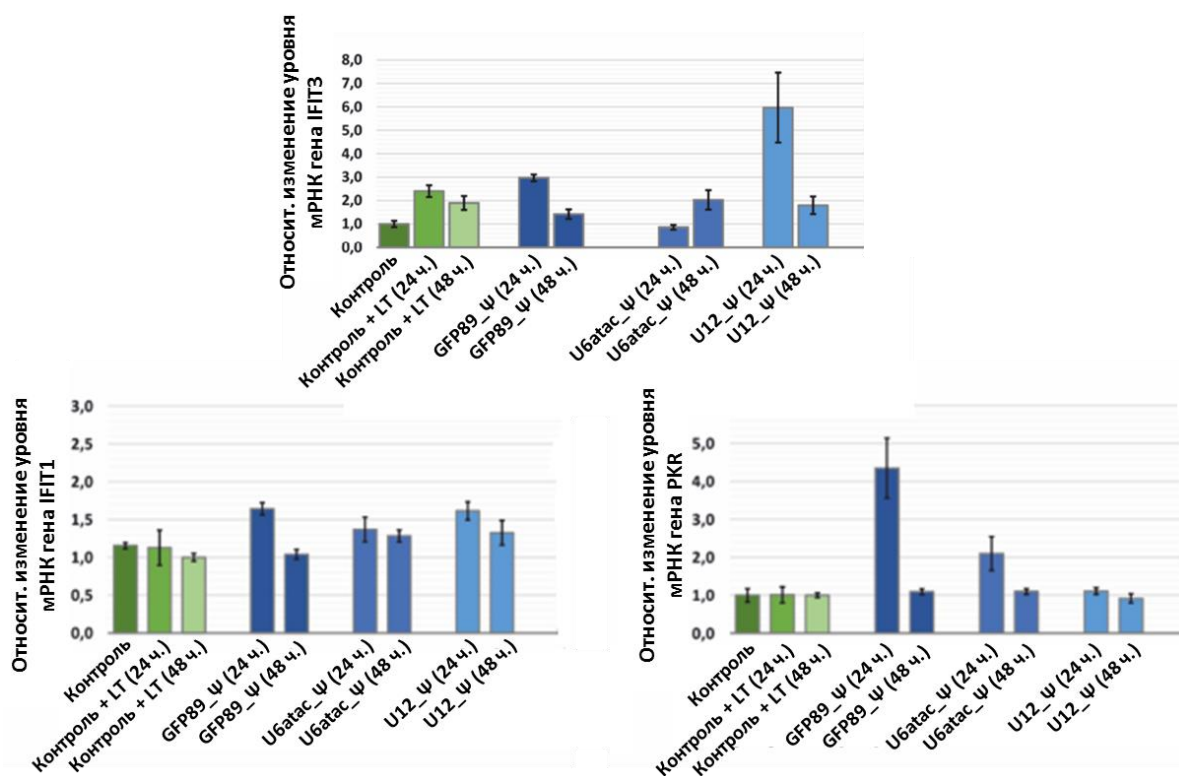


Рисунок 42 – Уровень мРНК генов IFIT3, IFIT1 и PKR в клетках SKOV3, трансфицированных синтетическими аналогами мяРНК, а также контрольной РНК GFP89, содержащими неканонический нуклеотид Ψ (100%) и структуры кэпа на 5'-конце. (Контроль – контрольные необработанные клетки SKOV3; LT – контрольные клетки SKOV3, обработанные липофектаминоном без какой-либо РНК; Ψ – псевдоуридин).

Однако результаты оценки цитотоксического действия полученных аналогов нкРНК на клетки MCF-7 (по данным МТТ-теста) позволили заключить, что замещение в составе синтетических РНК уридина на псевдоуридин, 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 (Рисунок 43). Аналогичные данные были получены в экспериментах на клетках SKOV3. Таким образом, для изучения специфичных путей функционирования аналогов мяРНК был выбран вариант модификации структуры РНК с полной заменой уридина на псевдоуридин и введение структуры соответствующего кэпа на 5'-конец.

3.2.3 Выбор оптимальных условий трансфекции

Следующий этап работы был посвящен анализу эффективности трансфекции, стабильности и выявлению локализации синтетических РНК-конструкций. Оценка эффективности трансфекции синтетическими аналогами нкРНК проводили методом обратной транскрипции с последующей ПЦР в реальном времени (Рисунок 44). Видно,

что уровни обеих мяРНК повышаются после трансфекции клеток соответствующими РНК-конструкциями, что говорит об успешности трансфекции.

В процессе трансфекции синтетическими РНК клеток деградация этих РНК может происходить как в культуральной среде, так и внутри клеток. Но только полноразмерные транскрипты аналогов мяРНК содержат все элементы последовательности, соответствующие природным РНК. Поэтому исследование свойств аналогов мяРНК и их действия на клетки человека целесообразно проводить в условиях, обеспечивающих продолжительную сохранность аналогов РНК в клетках.

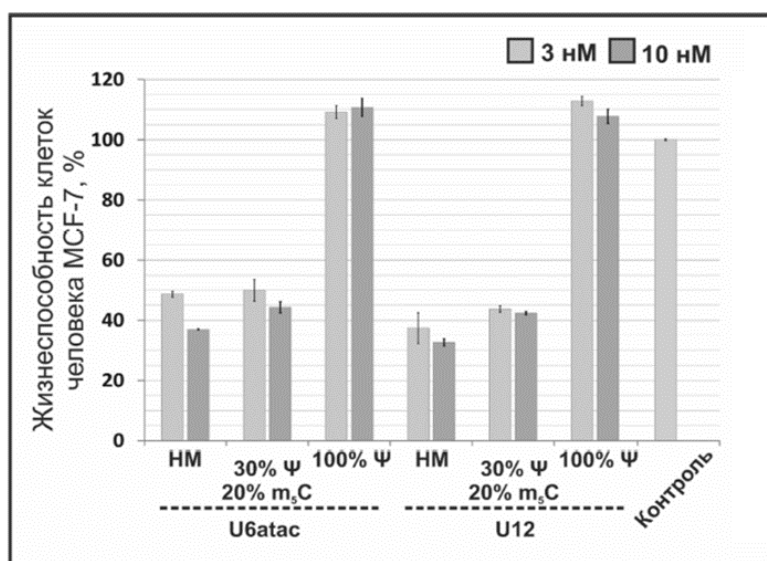


Рисунок 43 – Диаграмма изменения жизнеспособности клеток аденокарциномы молочной железы человека MCF-7 под действием аналогов U6atac и U12 мяРНК человека. Представлено среднее значение МТТ-индекса относительно контроля ± стандартное отклонение, рассчитанное по данным трех измерений. Жизнеспособность контрольных клеток принимали за 100%.

(НМ – 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).

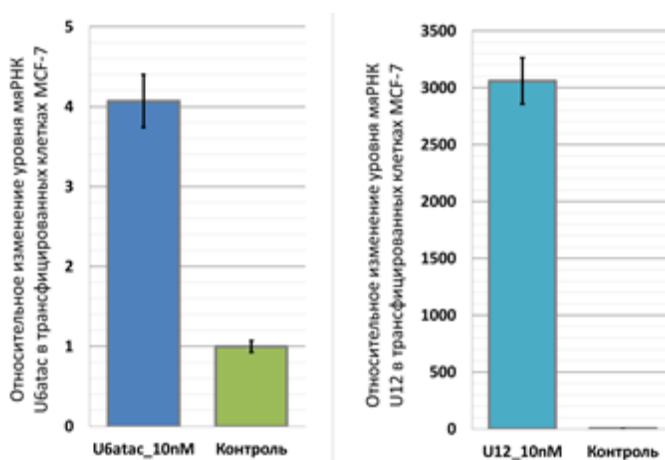


Рисунок 44 – Изменение выхода специфического продукта ОТ-ПЦР, соответствующего U6atac и U12 мяРНК – после трансфекции в клетках аденокарциномы молочной железы человека MCF-7 синтетических РНК-конструкций. Представлено среднее значение изменения уровня нкРНК относительно контрольных клеток с указанием стандартного отклонения, рассчитанного по данным трех независимых экспериментов.

Для того, чтобы проанализировать влияние неканонических нуклеотидов в составе аналогов мяРНК на стабильность таких РНК в ходе трансфекции клеток человека, нами были получены 5'-[³²P]-меченные аналоги малых нкРНК, которые затем были трансфицированы в клетки человека MCF-7 в комплексе с липидным трансфектантом: Липофектамин 3000 или RNAiMax (Рисунок 45). Видно, что полноразмерные аналоги мяРНК детектируются в клетках через 24 ч. после трансфекции и, по большей части, находятся в цитоплазме, однако также заметно их небольшое накопление и во фракции ядер. При пассивном методе трансфекции (без трансфицирующего агента) синтетические РНК подвергаются гидролизу по лабильным сайтам, поэтому полноразмерных форм РНК после пассивной трансфекции клеток не обнаружено ни в цитоплазматической, ни в ядерной фракциях.

Для визуализации накопления аналогов мяРНК в клетках проводили флуоресцентную конфокальную микроскопию клеток SKOV3, трансфицированных флуоресцентно мечеными РНК-конструкциями (Рисунок 46). Полученные данные позволили заключить, что синтетические РНК накапливаются преимущественно в цитоплазматической части клеток, часть флуоресцентных аналогов мяРНК проникает и в ядра клеток. Причем следует отметить, что синтетические аналоги с полной заменой уридина на псевдоуридин (Ψ) и со структурой кэпа на 5'-конце обеспечивали более интенсивный сигнал, что указывает на повышенную стабильность таких РНК-конструкций по сравнению с немодифицированными аналогами.

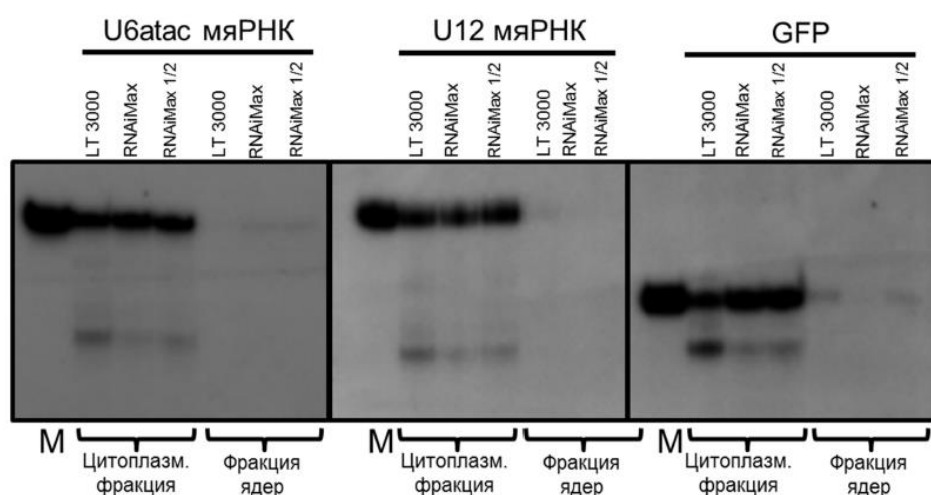


Рисунок 45 – Оценка стабильности U6atac и U12 мяРНК и контрольной РНК GFP с радиоактивными метками в цитоплазматической и ядерной фракциях после трансфекции клеток аденокарциномы молочной железы человека MCF-7 разными трансфицирующими агентами. (LT 3000 – липофектамин 3000; RNAiMax – липофектамин RNAiMax; М – маркер молекулярного веса).

В результате, для снижения неспецифических эффектов была выбрана полная замена уридина на псевдоуридин с включением моно- или три-метилированного кэпа как наиболее эффективная модификация.

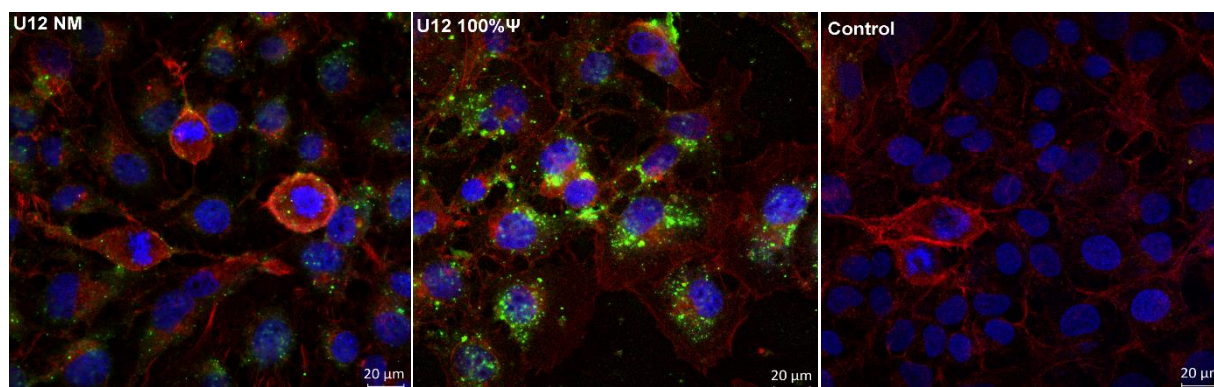


Рисунок 46 – Данные конфокальной микроскопии, отражающие локализацию аналогов U12 мРНК через 24 ч. после трансфекции клеток рака яичника SKOV3. Аналоги РНК были синтезированы с содержанием 25% AA-UTP + FITC. Масштаб: 20 мкм. (НМ – немодифицированные аналоги с трифосфатом на 5'-конце)

3.2.4 Выявление механизмов участия циркулирующих во внеклеточном пространстве мРНК в межклеточной коммуникации

Для установления глобальных путей функционирования экзогенных мРНК внутри реципиентных раковых клеток мы использовали (I) метод глубокого секвенирования транскриптома на платформе Illumina (NextSeq System) и (II) метод тандемной масс-спектрометрии, совмещенной с обращенно-фазовой жидкостной хроматографией.

3.2.4.1 Анализ дифференциальной экспрессии генов в раковых клетках, трансфицированных синтетическими аналогами мРНК

Нами было произведено параллельное секвенирование полиаденилированной фракции суммарной РНК из клеток аденокарциномы яичников SKOV3 через 48 ч. после трансфекции аналогами мРНК в трех биологических повторах:

- 1) клетки SKOV3, трансфицированные U12 мРНК,
- 2) клетки SKOV3, трансфицированные Ubatas мРНК,
- 3) клетки SKOV3, трансфицированные неспецифической контрольной РНК – фрагментом мРНК гена GFP (89 нк),
- 4) контрольные (необработанные) клетки SKOV3 с липофектаминоном RNAiMax без добавления какой-либо РНК.

Перед транскриптомным анализом с помощью ОТ-ПЦР была произведена оценка эффективности трансфекции (Рисунок 47). Было установлено, что уровни всех экзогенных мяРНК значимо повышались в клетках SKOV3 через 48 ч. после трансфекции.

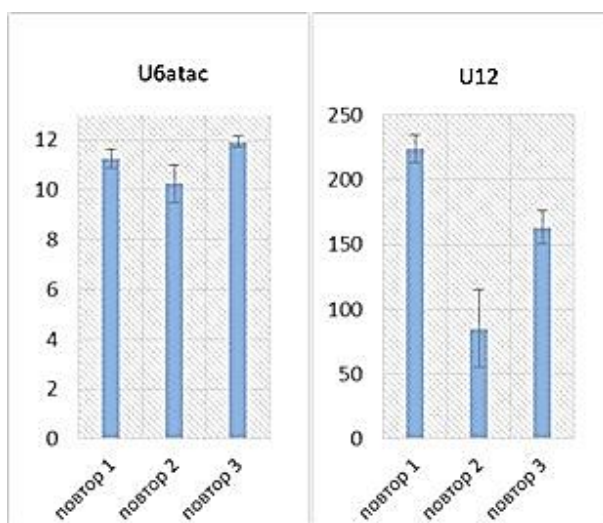


Рисунок 47 – Диаграммы, отражающие уровень соответствующих мяРНК (Ubatas и U12) в клетках рака яичника SKOV3 через 48 часов после трансфекции аналогами мяРНК. Представлено среднее значение (с нормировкой на 18S рРНК) изменения уровня мяРНК относительно контрольных клеток с указанием стандартного отклонения, рассчитанного по данным трех независимых экспериментов ОТ-ПЦР.

Далее был проведен биоинформатический анализ полученных данных секвенирования. Дифференциальная экспрессия генов была оценена с помощью программы “Htseq+Edger” (более подробная информация приведена в главе II. Экспериментальная часть). Данные дифференциальной экспрессии в образцах относительно контрольных необработанных клеток приведены в Таблице 8.

Таблица 8 – Дифференциальная экспрессия генов во всех образцах против контрольных образцов с липофектомином RNAiMax.

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 (Рисунок 48А-Б).

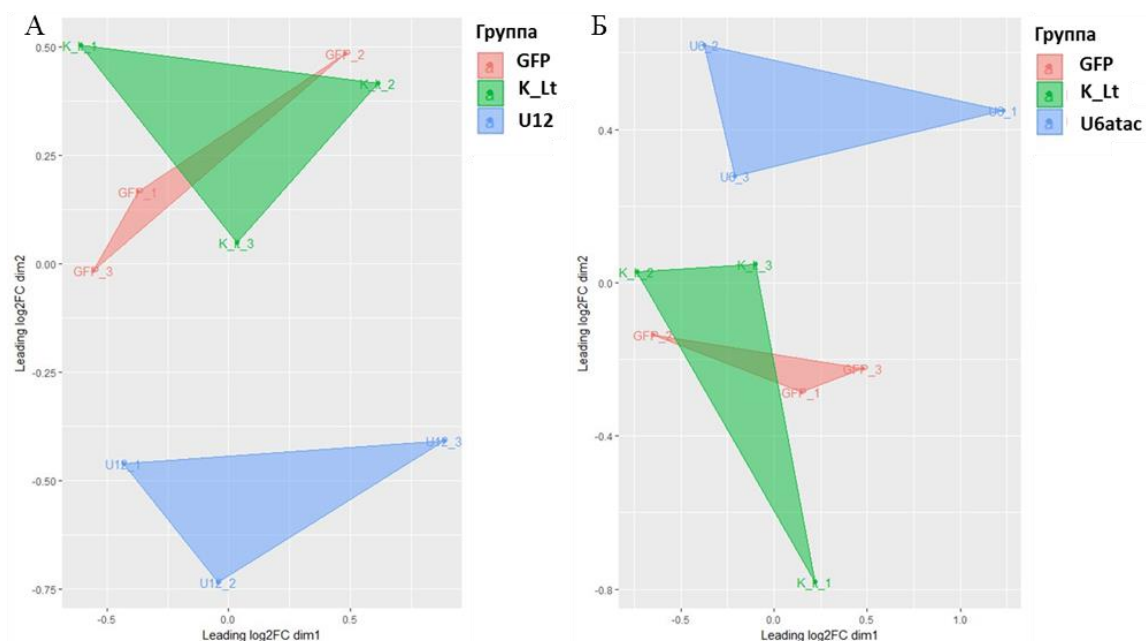


Рисунок 48 – Метод многомерного шкалирования (MDS) всех экспрессирующихся генов отражает значительные изменения между контрольными клетками (зеленый и красный цвета) и клетками, трансфицированными (А) U12 мяРНК, (Б) U6atac мяРНК (синий цвет).

Для функциональной аннотации дифференциально экспрессирующихся генов были использованы базы данных Gene Ontology, KEGG, Reactome и пакеты языка программирования R “clusterprofiler”, “ReactomePA”. Пороговым уровнем отсечения считали $pvalue < 0,05$. Для того, чтобы избавиться от зашумленности анализа представленности терминов генной онтологии, был использован алгоритм “weight” из пакета “topGO” языка программирования R. Этот подход помогает понять, насколько рассматриваемый термин представлен лучше или хуже, чем все его окружение (“дети” и “родители”).

Первым существенным результатом функционального анализа групп генов с изменившейся экспрессией является отсутствие обогащения в группах генов врожденного иммунного ответа, или интерферонового ответа. Активация неспецифической системы врожденного иммунного ответа клеток человека является нежелательным, но характерным признаком трансфекции синтетических РНК в клетки человека. Полученный нами результат по данным транскриптомного секвенирования указывает на правильность выбора клеточной модели (клеток аденокарциномы яичника SKOV3), а также корректность выбора модификаций в структуре РНК-конструкций. Отсутствие активации

интерферон-чувствительных сигнальных путей позволяет выявлять специфичные пути функционирования каждого типа РНК.

Функциональная аннотация генов с повышенной экспрессией в клетках SKOV3 после трансфекции U12 и U6atac мяРНК выявила, что оба типа мяРНК приводят к активации генов, вовлеченных в регуляцию клеточного цикла, а особенно генов, важных для М-фазы (Рисунок 49). U12 и U6atac мяРНК приводили к повышению экспрессии 100 и 35 генов, относящихся к М фазе клеточного цикла, соответственно.

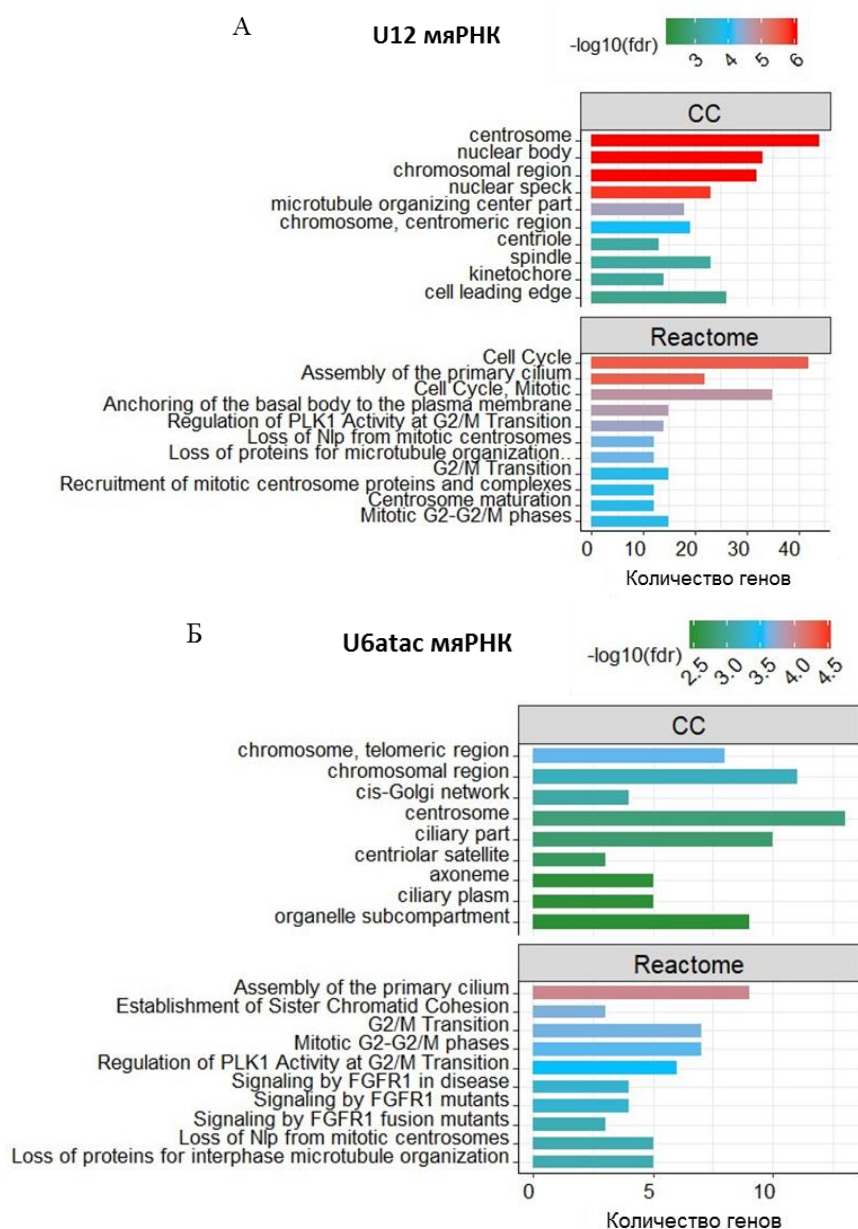


Рисунок 49 – Статистически значимые ($p < 0,05$) кластеры генов, дифференциально повышенные в клетках SKOV3, трансфицированных U12 мяРНК, относительно контрольных клеток. Данные обогащения получены с использованием баз данных Gene Ontology Biological Processes (BP), Cell Component (CC) и Reactome.

Большая часть этих генов кодируют белки centrosомы (AKAP9, OFD1, SPICE1, CEP63, CEP152, CEP70, CNTRL, PCM1, STIL и др.), которые, в свою очередь,

контролируют прогрессию клеточного цикла и сборку кинетохор и веретена деления. По-видимому, экзогенные мяРНК минорной сплайсосомы выполняют неканонические функции, так как нами не обнаружено изменений в генах, содержащих минорные интроны, ни на уровне экспрессии, ни уровне сплайсинга. Таким образом, экзогенные сплайсосомные мяРНК могут влиять на регуляцию клеточного цикла, что согласуется с работой [217], в которой было показано, что сверхэкспрессия одного из сплайсинговых факторов (в частности SRSF1) также приводила к активации генов, относящихся к М-фазе. Помимо этого, существует целый ряд исследований, показывающих взаимосвязь сплайсосомных белков и клеточного цикла [218-222]. Однако, нам впервые удалось показать, что на активацию генов митотической фазы клеточного цикла, влияют не только сплайсинговые белки, но также и сплайсосомные малые ядерные РНК (U12 и U6atac).

Кроме того, было зафиксировано, что мяРНК приводили к повышению транскрипции мРНК, которые кодируют белки, относящиеся к раку, такие как RBBP8, LRG1, KIAA1524, EPS15 положительно регулирующие пролиферацию клеток, а также OFD1 и LRG4, которые являются активатором одного из онкогенных путей, а именно, WNT-сигнального пути. Также, 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 эпителиально-мезенхимальной пластичности раковых клеток, а именно, генов OVOL1, SLUG, ZEB1, ZEB2, TWIST1 (Рисунок 50).

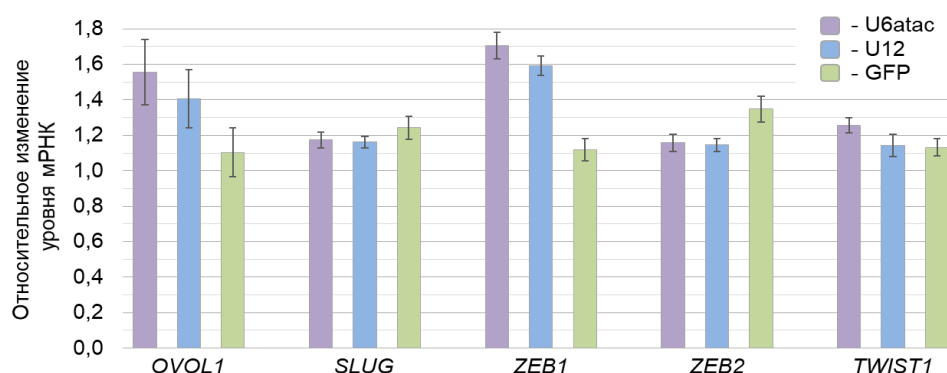


Рисунок 50 – Уровень мРНК генов OVOL1, SLUG, ZEB1, ZEB2, TWIST1 в клетках SKOV3, трансфицированных аналогами U6atac и U12 мяРНК и фрагментом GFP. Представлено среднее значение (с нормировкой на GAPDH и HPRT) изменения уровня мРНК каждого гена относительно контрольных клеток с указанием стандартного отклонения, рассчитанного по данным трех независимых экспериментов. Референсные гены: GAPDH и HPRT.

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.

3.2.4.2 Анализ протеома в раковых клетках, трансфицированных синтетическими аналогами мяРНК

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 U6atac) в двух биологических повторах. В качестве контроля взяты клетки, обработанные липофектами без каких-либо РНК, и клетки, трансфицированные фрагментом мРНК гена GFP. Трансфекция производилась при тех же условиях, как для транскрипционного профилирования.

Для проведения протеомного анализа клетки разрушали ультразвуком и измеряли концентрацию белка, затем равные количества белка каждого из тотальных лизатов клеток разделяли в низкопроцентном полиакриламидном геле. Фрагменты геля были нарезаны на мелкие части, образцы были подвергнуты разрушению дисульфидных связей, алкилированы, обесцвечены от красителя, дегидратированы и подвергнуты трипсинолизу в геле. Полученные пептиды экстрагировали из геля, концентрировали и растворяли в буфере для масс-спектрометрии перед LC-MS/MS анализом (более подробная информация приведена в главе II. Экспериментальная часть).

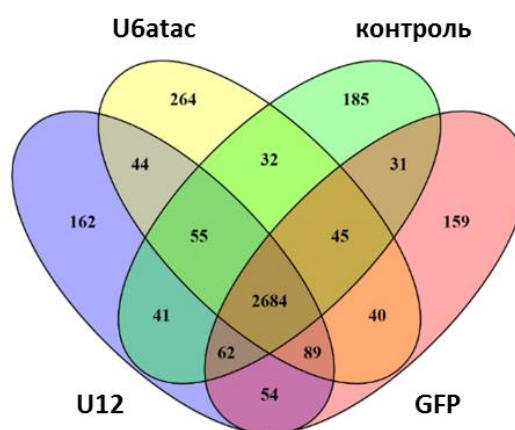


Рисунок 51 – Распределение белков, идентифицированных в клетках, трансфицированных U12 и U6atac мяРНК.

В целом, было идентифицировано 4813 белков (Рисунок 51). 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.

Данные дифференциальной представленности белков в образцах относительно контрольных необработанных клеток приведены в Таблице 9. Для того чтобы выяснить, какие биологические процессы преимущественно активируются после попадания экзогенных нкРНК в клетки, мы использовали базы данных KEGG, Reactome и Gene Ontology.

Таблица 9 – Дифференциальная представленность белков во всех образцах против контрольных образцов с липофектаминоом.

Группы сравнения	Количество белков с повышенной представленностью	Количество белков с пониженной представленностью
U12	355	295
U6atac	438	323
фрагмент GFP	347	318

Интересно, что среди дифференциально повышенных белков в клетках, трансфицированных как U12, так и U6atac мяРНК, одни из самых значимых отличий наблюдались для кластеров регуляции клеточного цикла, а также митотической фазы клеточного цикла, что хорошо коррелирует с данными транскриптомного анализа (Рисунок 49). Кроме того, эти данные были подтверждены анализом клеточного цикла (Рисунок 52).

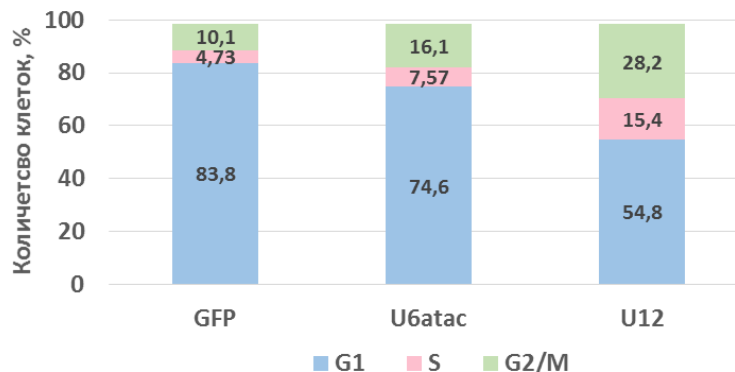


Рисунок 52 – Анализ клеточного цикла клеток SKOV3 через 3 дня после трансфекции U12, U6atac мяРНК или контрольным фрагментом GFP (89 нк).

Причем, именно на уровне протеома было зафиксировано, что трансфекция мяРНК приводит к повышению представленности основных регуляторов митоза. Так, после трансфекции U12 мяРНК наблюдалось повышение представленности циклина В1 (CCNB1), количество которого перед митозом резко увеличивается. Циклин В1 участвует в ранних событиях митоза, таких как конденсация хромосом и сборка веретена деления. Кроме того, наблюдалось повышение киназы Аугора В (AURKB) после трансфекции U6atac мяРНК, эта киназа участвует в процессе конденсации и разделения сестринских хроматид. Помимо обнаружения ключевых активаторов митоза, после трансфекции

обеими мяРНК наблюдалось увеличение представленности белков, входящих в комплекс, стимулирующий анафазу APCcdc20, а именно, повышалась представленность белков, являющихся субъединицами самого комплекса, стимулирующего анафазу (APC1, APC4 и APC5), так и активатора данного комплекса – белка клеточного цикла 20 (CDC20), который присоединяется к комплексу APC при переходе клетки из метафазы в анафазу.

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 митотическую фазу клеточного цикла, повышается представленность генов и белков, относящихся к событиям профазы митоза, а также появляются ключевые регуляторы, позволяющие клетке переходить из метафазы в анафазу.

Суммируя всё вышеизложенное можно сказать, что в данной работе мы впервые провели комплексное исследование действия экзогенных мяРНК на раковые клетки. Было установлено, что короткие регуляторные нкРНК, попадая в клетки из внеклеточного пространства, выполняют неканонические функции. Так, мы показали, что сплайсосомные малые ядерные РНК (U12 и Ubatas) могут влиять на активацию генов митотической фазы клеточного цикла. Мы считаем, что ключевым критерием изменения функции мяРНК является изменение их локализации в клетке, что подтверждает гипотезу о глобальной роли коротких РНК, а также их фрагментов, в качестве переносчиков стрессовых сигналов между клетками.

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 мРНК 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 мРНК. В связи с этим, мы впервые предположили, что эффект секретомов может частично обуславливаться наличием в них мРНК 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 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 секретомы 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 секретомы *in vivo* и *in vitro* после химиотерапии способствуют формированию химиорезистентности реципиентных раковых клеток.

4) Проведено комплексное исследование действия экзогенных мяРНК 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 ЛИТЕРАТУРЫ

1. Recurrent epithelial ovarian cancer: an update on treatment/ O.W. Foley, J.A. Rauh-Hain, M.G. del Carmen// *Oncology (Williston Park)*.-2013.-Vol.27; no.4.-P.288-94, 298.
2. Intercellular Transfer of Splicing Factors via Extracellular Vesicles Promotes Glioblastoma Growth and Therapy Resistance/ M.S. Pavlyukov, A. Mohyeldin, V.O. Shender, et al.// *The FASEB Journal*.-2016.-Vol.30; no.1 Supplement.-P.590.2.
3. Therapy-induced tumour secretomes promote resistance and tumour progression/ A.C. Obenauf, Y. Zou, A.L. Ji, et al.// *Nature*.-2015.-Vol.520; no.7547.-P.368-72.
4. Caspase 3-mediated stimulation of tumor cell repopulation during cancer radiotherapy/ Q. Huang, F. Li, X. Liu, et al.// *Nat Med*.-2011.-Vol.17; no.7.-P.860-6.
5. Senescence-associated reprogramming promotes cancer stemness/ M. Milanovic, D.N.Y. Fan, D. Belenki, et al.// *Nature*.-2018.-Vol.553; no.7686.-P.96-100.
6. Rapid selection of BRCA1-proficient tumor cells during neoadjuvant therapy for ovarian cancer in BRCA1 mutation carriers/ A.P. Sokolenko, E.L. Savonevich, A.O. Ivantsov, et al.// *Cancer Lett*.-2017.-Vol.397; 127-132.
7. Radiation to stromal fibroblasts increases invasiveness of pancreatic cancer cells through tumor-stromal interactions/ K. Ohuchida, K. Mizumoto, M. Murakami, et al.// *Cancer Res*.-2004.-Vol.64; no.9.-P.3215-22.
8. Proteome-metabolome profiling of ovarian cancer ascites reveals novel components involved in intercellular communication/ V.O. Shender, M.S. Pavlyukov, R.H. Ziganshin, et al.// *Mol Cell Proteomics*.-2014.-Vol.13; no.12.-P.3558-71.
9. FAS Death Receptor: A Breast Cancer Subtype-Specific Radiation Response Biomarker and Potential Therapeutic Target/ J.K. Horton, S. Siamakpour-Reihani, C.T. Lee, et al.// *Radiat Res*.-2015.-Vol.184; no.5.-P.456-69.
10. Gene expression profiling reveals epithelial mesenchymal transition (EMT) genes can selectively differentiate eribulin sensitive breast cancer cells/ Z. Dezso, J. Oestreicher, A. Weaver, et al.// *PLoS One*.-2014.-Vol.9; no.8.-P.106-131.
11. IRF-1 expression is induced by cisplatin in ovarian cancer cells and limits drug effectiveness/ S. Pavan, M. Olivero, D. Cora, et al.// *Eur J Cancer*.-2013.-Vol.49; no.4.-P.964-73.
12. Getting to know ovarian cancer ascites: opportunities for targeted therapy-based translational research/ N. Ahmed, K.L. Stenvers// *Front Oncol*.-2013.-Vol.3; 256.
13. Ascites modulates cancer cell behavior, contributing to tumor heterogeneity in ovarian cancer/ S. Kim, B. Kim, Y.S. Song// *Cancer Sci*.-2016.-Vol.107; no.9.-P.1173-8.
14. Drug resistance in cancer: an overview/ G. Housman, S. Byler, S. Heerboth, et al.// *Cancers (Basel)*.-2014.-Vol.6; no.3.-P.1769-92.

15. Cancer drug resistance: an evolving paradigm/ C. Holohan, S. Van Schaeybroeck, D.B. Longley, et al.// *Nat Rev Cancer*.-2013.-Vol.13; no.10.-P.714-26.
16. Epigenetic determinants of resistance to etoposide regulation of Bcl-X(L) and Bax by tumor microenvironmental factors/ S.T. Taylor, J.A. Hickman, C. Dive// *J Natl Cancer Inst*.-2000.-Vol.92; no.1.-P.18-23.
17. Cancer stem cell definitions and terminology: the devil is in the details/ P. Valent, D. Bonnet, R. De Maria, et al.// *Nat Rev Cancer*.-2012.-Vol.12; no.11.-P.767-75.
18. Colon cancer stem cells: promise of targeted therapy/ M. Todaro, M.G. Francipane, J.P. Medema, et al.// *Gastroenterology*.-2010.-Vol.138; no.6.-P.2151-62.
19. Prognostic impact of ALDH1 in breast cancer: a story of stem cells and tumor microenvironment/ E. Resatkova, J.S. Reis-Filho, R.K. Jain, et al.// *Breast Cancer Res Treat*.-2010.-Vol.123; no.1.-P.97-108.
20. ABC transporters, drug resistance, and cancer stem cells/ M. Dean// *J Mammary Gland Biol Neoplasia*.-2009.-Vol.14; no.1.-P.3-9.
21. The cancer stem cell: premises, promises and challenges/ H. Clevers// *Nat Med*.-2011.-Vol.17; no.3.-P.313-9.
22. Ascites Increases Expression/Function of Multidrug Resistance Proteins in Ovarian Cancer Cells/ L. Mo, V. Pospichalova, Z. Huang, et al.// *PLoS One*.-2015.-Vol.10; no.7.-P.e0131579.
23. The effects of deregulated DNA damage signalling on cancer chemotherapy response and resistance/ P. Bouwman, J. Jonkers// *Nat Rev Cancer*.-2012.-Vol.12; no.9.-P.587-98.
24. Explaining the high mutation rates of cancer cells to drug and multidrug resistance by chromosome reassortments that are catalyzed by aneuploidy/ P. Duesberg, R. Stindl, R. Hehlmann// *Proc Natl Acad Sci U S A*.-2000.-Vol.97; no.26.-P.14295-300.
25. Angiogenesis and tumor growth inhibition by a matrix metalloproteinase inhibitor targeting radiation-induced invasion/ A. Kaliski, L. Maggiorella, K.A. Cengel, et al.// *Mol Cancer Ther*.-2005.-Vol.4; no.11.-P.1717-28.
26. Induction of MET by ionizing radiation and its role in radioresistance and invasive growth of cancer/ F. De Bacco, P. Luraghi, E. Medico, et al.// *J Natl Cancer Inst*.-2011.-Vol.103; no.8.-P.645-61.
27. Spreading the word: non-autonomous effects of apoptosis during development, regeneration and disease/ A. Perez-Garijo, H. Steller// *Development*.-2015.-Vol.142; no.19.-P.3253-62.
28. Intercellular transmission of the unfolded protein response promotes survival and drug resistance in cancer cells/ J.J. Rodvold, K.T. Chiu, N. Hiramatsu, et al.// *Sci Signal*.-2017.-Vol.10; no.482.-P.1-12.

29. Apoptosis and Compensatory Proliferation Signaling Are Coupled by CrkI-Containing Microvesicles/ K.H. Gupta, J.W. Goldufsky, S.J. Wood, et al.// *Dev Cell.*-2017.-Vol.41; no.6.-P.674-684.
30. Live to die another way: modes of programmed cell death and the signals emanating from dying cells/ Y. Fuchs, H. Steller// *Nat Rev Mol Cell Biol.*-2015.-Vol.16; no.6.-P.329-44.
31. Apoptosis-induced compensatory proliferation. The Cell is dead. Long live the Cell!/ Y. Fan, A. Bergmann// *Trends Cell Biol.*-2008.-Vol.18; no.10.-P.467-73.
32. Intercellular Transfer of Splicing Factors via Extracellular Vesicles Promotes Glioblastoma Growth and Therapy Resistance/ M.S. Pavlyukov, A. Mohyeldin, V.O. Shender, et al.// *The FASEB Journal.*-2016.-Vol.30; no.1 Supplement.-P.590.
33. Developmental parameters of cell death in the wing disc of *Drosophila*/ M. Milan, S. Campuzano, A. Garcia-Bellido// *Proc Natl Acad Sci U S A.*-1997.-Vol.94; no.11.-P.5691-6.
34. The effects of X-rays on the proliferation dynamics of cells in the imaginal wing disc of *Drosophila melanogaster*/ J.L. Haynie, P.J. Bryant// *Wilehm Roux Arch Dev Biol.*-1977.-Vol.183; no.2.-P.85-100.
35. The intestinal epithelium compensates for p53-mediated cell death and guarantees organismal survival/ Y.A. Valentin-Vega, H. Okano, G. Lozano// *Cell Death Differ.*-2008.-Vol.15; no.11.-P.1772-81.
36. Spatial and temporal patterns of expression of epidermal growth factor, transforming growth factor alpha and transforming growth factor beta 1-3 and their receptors in mouse jejunum after radiation treatment/ A.C. Ruifrok, K.A. Mason, G. Lozano, et al.// *Radiat Res.*-1997.-Vol.147; no.1.-P.1-12.
37. The role of apoptosis-induced proliferation for regeneration and cancer/ H.D. Ryoo, A. Bergmann// *Cold Spring Harb Perspect Biol.*-2012.-Vol.4; no.8.-P.1-17.
38. Compensatory proliferation and apoptosis-induced proliferation: a need for clarification/ B. Mollereau, A. Perez-Garijo, A. Bergmann, et al.// *Cell Death Differ.*-2013.-Vol.20; no.1.-P.1-2.
39. Hallmarks of cancer: the next generation/ D. Hanahan, R.A. Weinberg// *Cell.*-2011.-Vol.144; no.5.-P.646-74.
40. Epithelial-Mesenchymal Plasticity: A Central Regulator of Cancer Progression/ X. Ye, R.A. Weinberg// *Trends Cell Biol.*-2015.-Vol.25; no.11.-P.675-86.
41. Epithelial mesenchymal transition in early invasive breast cancer: an immunohistochemical and reverse phase protein array study/ M.A. Aleskandarany, O.H. Negm, A.R. Green, et al.// *Breast Cancer Res Treat.*-2014.-Vol.145; no.2.-P.339-48.

42. EMT inducers catalyze malignant transformation of mammary epithelial cells and drive tumorigenesis towards claudin-low tumors in transgenic mice/ A.P. Morel, G.W. Hinkal, C. Thomas, et al.// *PLoS Genet.*-2012.-Vol.8; no.5.-P.e1002723.
43. Paracrine and autocrine signals induce and maintain mesenchymal and stem cell states in the breast/ C. Scheel, E.N. Eaton, S.H. Li, et al.// *Cell.*-2011.-Vol.145; no.6.-P.926-40.
44. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease/ J.P. Thiery, H. Acloque, R.Y. Huang, et al.// *Cell.*-2009.-Vol.139; no.5.-P.871-90.
45. Epithelial-mesenchymal interconversions in normal ovarian surface epithelium and ovarian carcinomas: an exception to the norm/ N. Ahmed, E.W. Thompson, M.A. Quinn// *J Cell Physiol.*-2007.-Vol.213; no.3.-P.581-8.
46. In-depth proteomics of ovarian cancer ascites: combining shotgun proteomics and selected reaction monitoring mass spectrometry/ S. Elschenbroich, V. Ignatchenko, B. Clarke, et al.// *J Proteome Res.*-2011.-Vol.10; no.5.-P.2286-99.
47. Combinatorial peptide libraries facilitate development of multiple reaction monitoring assays for low-abundance proteins/ A.P. Drabovich, E.P. Diamandis// *J Proteome Res.*-2010.-Vol.9; no.3.-P.1236-45.
48. A proteome resource of ovarian cancer ascites: integrated proteomic and bioinformatic analyses to identify putative biomarkers/ L. Gortzak-Uzan, A. Ignatchenko, A.I. Evangelou, et al.// *J Proteome Res.*-2008.-Vol.7; no.1.-P.339-51.
49. Elevated AKAP12 in paclitaxel-resistant serous ovarian cancer cells is prognostic and predictive of poor survival in patients/ N.W. Bateman, E. Jaworski, W. Ao, et al.// *J Proteome Res.*-2015.-Vol.14; no.4.-P.1900-10.
50. Identification of candidate circulating cisplatin-resistant biomarkers from epithelial ovarian carcinoma cell secretomes/ P.N. Teng, G. Wang, B.L. Hood, et al.// *Br J Cancer.*-2014.-Vol.110; no.1.-P.123-32.
51. Comparative secretome analysis of epithelial and mesenchymal subpopulations of head and neck squamous cell carcinoma identifies S100A4 as a potential therapeutic target/ K. Rasanen, S. Sriswasdi, A. Valiga, et al.// *Mol Cell Proteomics.*-2013.-Vol.12; no.12.-P.3778-92.
52. In-depth proteomic profiling of the uveal melanoma secretome/ M. Angi, H. Kalirai, S. Prendergast, et al.// *Oncotarget.*-2016.-Vol.7; no.31.-P.49623-49635.
53. Quantitative Secretomic Analysis Identifies Extracellular Protein Factors That Modulate the Metastatic Phenotype of Non-Small Cell Lung Cancer/ R. Hu, K.E. Huffman, M. Chu, et al.// *J Proteome Res.*-2016.-Vol.15; no.2.-P.477-86.
54. Molecular characterization of the tumor microenvironment in breast cancer/ M. Allinen, R. Beroukhi, L. Cai, et al.// *Cancer Cell.*-2004.-Vol.6; no.1.-P.17-32.

55. Proteomic characterization of the interstitial fluid perfusing the breast tumor microenvironment: a novel resource for biomarker and therapeutic target discovery/ J.E. Celis, P. Gromov, T. Cabezón, et al.// *Mol Cell Proteomics*.-2004.-Vol.3; no.4.-P.327-44.
56. Biomarker discovery from pancreatic cancer secretome using a differential proteomic approach/ M. Gronborg, T.Z. Kristiansen, A. Iwahori, et al.// *Mol Cell Proteomics*.-2006.-Vol.5; no.1.-P.157-71.
57. Unconventional secretion is a major contributor of cancer cell line secretomes/ L. Villarreal, O. Mendez, C. Salvans, et al.// *Mol Cell Proteomics*.-2013.-Vol.12; no.5.-P.1046-60.
58. Exosomes Secreted by Apoptosis-Resistant Acute Myeloid Leukemia (AML) Blasts Harbor Regulatory Network Proteins Potentially Involved in Antagonism of Apoptosis/ A. Wojtuszkiewicz, G.J. Schuurhuis, F.L. Kessler, et al.// *Mol Cell Proteomics*.-2016.-Vol.15; no.4.-P.1281-98.
59. The tumor suppressor PTEN is exported in exosomes and has phosphatase activity in recipient cells/ U. Putz, J. Howitt, A. Doan, et al.// *Sci Signal*.-2012.-Vol.5; no.243.-P.1-11.
60. Single proteins might have dual but related functions in intracellular and extracellular microenvironments/ D.C. Radisky, M. Stallings-Mann, Y. Hirai, et al.// *Nat Rev Mol Cell Biol*.-2009.-Vol.10; no.3.-P.228-34.
61. Proteomic identification of multitasking proteins in unexpected locations complicates drug targeting/ G.S. Butler, C.M. Overall// *Nat Rev Drug Discov*.-2009.-Vol.8; no.12.-P.935-48.
62. The road taken: past and future foundations of membrane traffic/ I. Mellman, G. Warren// *Cell*.-2000.-Vol.100; no.1.-P.99-112.
63. Protein translocation across the endoplasmic reticulum/ P. Walter, R. Gilmore, G. Blobel// *Cell*.-1984.-Vol.38; no.1.-P.5-8.
64. Intracellular aspects of the process of protein synthesis/ G. Palade// *Science*.-1975.-Vol.189; no.4206.-P.867.
65. The mystery of nonclassical protein secretion. A current view on cargo proteins and potential export routes/ W. Nickel// *Eur J Biochem*.-2003.-Vol.270; no.10.-P.2109-19.
66. Pathways of Unconventional Protein Secretion/ C. Rabouille// *Trends Cell Biol*.-2017.-Vol.27; no.3.-P.230-240.
67. Unconventional secretion: a stress on GRASP/ F. Giuliani, A. Grieve, C. Rabouille// *Curr Opin Cell Biol*.-2011.-Vol.23; no.4.-P.498-504.
68. Small Molecule Inhibitors Targeting Tec Kinase Block Unconventional Secretion of Fibroblast Growth Factor 2/ G. La Venuta, S. Wegehingel, P. Sehr, et al.// *J Biol Chem*.-2016.-Vol.291; no.34.-P.17787-803.

69. HIV-Tat Protein Forms Phosphoinositide-dependent Membrane Pores Implicated in Unconventional Protein Secretion/ M. Zeitler, J.P. Steringer, H.M. Muller, et al.// *J Biol Chem.*-2015.-Vol.290; no.36.-P.21976-84.
70. A direct role for ATP1A1 in unconventional secretion of fibroblast growth factor 2/ S. Zacherl, G. La Venuta, H.M. Muller, et al.// *J Biol Chem.*-2015.-Vol.290; no.6.-P.3654-65.
71. Rerouting of fibroblast growth factor 2 to the classical secretory pathway results in post-translational modifications that block binding to heparan sulfate proteoglycans/ S. Wegehingel, C. Zehe, W. Nickel// *FEBS Lett.*-2008.-Vol.582; no.16.-P.2387-92.
72. Pore-forming activity and structural autoinhibition of the gasdermin family/ J. Ding, K. Wang, W. Liu, et al.// *Nature.*-2016.-Vol.535; no.7610.-P.111-6.
73. P2X7 receptor activation regulates rapid unconventional export of transglutaminase-2/ M. Adamczyk, R. Griffiths, S. Dewitt, et al.// *J Cell Sci.*-2015.-Vol.128; no.24.-P.4615-28.
74. Purines, purinergic receptors, and cancer/ F. Di Virgilio// *Cancer Res.*-2012.-Vol.72; no.21.-P.5441-7.
75. Introduction to purinergic signalling in the brain/ G. Burnstock// *Adv Exp Med Biol.*-2013.-Vol.986; 1-12.
76. Extrinsic purinergic regulation of neural stem/progenitor cells: implications for CNS development and repair/ H. Ulrich, M.P. Abbracchio, G. Burnstock// *Stem Cell Rev.*-2012.-Vol.8; no.3.-P.755-67.
77. P2X4 receptors mediate PGE2 release by tissue-resident macrophages and initiate inflammatory pain/ L. Ulmann, H. Hirbec, F. Rassendren// *EMBO J.*-2010.-Vol.29; no.14.-P.2290-300.
78. Evolutionary origins of the purinergic signalling system/ G. Burnstock, A. Verkhratsky// *Acta Physiol (Oxf).*-2009.-Vol.195; no.4.-P.415-47.
79. Protein-phospholipid interactions in nonclassical protein secretion: problem and methods of study/ I. Prudovsky, T.K. Kumar, S. Sterling, et al.// *Int J Mol Sci.*-2013.-Vol.14; no.2.-P.3734-72.
80. Digesting the Expanding Mechanisms of Autophagy/ N.T. Ktistakis, S.A. Tooze// *Trends Cell Biol.*-2016.-Vol.26; no.8.-P.624-35.
81. Secretory autophagy/ M. Ponpuak, M.A. Mandell, T. Kimura, et al.// *Curr Opin Cell Biol.*-2015.-Vol.35; 106-16.
82. Unconventional secretion of Acb1 is mediated by autophagosomes/ J.M. Duran, C. Anjard, C. Stefan, et al.// *J Cell Biol.*-2010.-Vol.188; no.4.-P.527-36.

83. Autophagosomes, phagosomes, autolysosomes, phagolysosomes, autophagolysosomes... wait, I'm confused/ D.J. Klionsky, E.L. Eskelinen, V. Deretic// *Autophagy*.-2014.-Vol.10; no.4.-P.549-51.
84. Maturing reticulocytes internalize plasma membrane in glycophorin A-containing vesicles that fuse with autophagosomes before exocytosis/ R.E. Griffiths, S. Kupzig, N. Cogan, et al// *Blood*.-2012.-Vol.119; no.26.-P.6296-306.
85. Exosomes and autophagy: coordinated mechanisms for the maintenance of cellular fitness/ F. Baixauli, C. Lopez-Otin, M. Mittelbrunn// *Front Immunol*.-2014.-Vol.5; 403.
86. Golgi bypass: skirting around the heart of classical secretion/ A.G. Grieve, C. Rabouille// *Cold Spring Harb Perspect Biol*.-2011.-Vol.3; no.4.-P.a005298.
87. Metabolic pathways promoting cancer cell survival and growth/ L.K. Boroughs, R.J. DeBerardinis// *Nat Cell Biol*.-2015.-Vol.17; no.4.-P.351-9.
88. On the origin of cancer cells/ O. Warburg// *Science*.-1956.-Vol.123; no.3191.-P.309-14.
89. Lipid metabolic reprogramming in cancer cells/ S. Beloribi-Djefalia, S. Vasseur, F. Guillaumond// *Oncogenesis*.-2016.-Vol.5; e189.
90. The role of lipid droplets and adipocytes in cancer. Raman imaging of cell cultures: MCF10A, MCF7, and MDA-MB-231 compared to adipocytes in cancerous human breast tissue/ H. Abramczyk, J. Surmacki, M. Kopec, et al// *Analyst*.-2015.-Vol.140; no.7.-P.2224-35.
91. Intratumor cholesteryl ester accumulation is associated with human breast cancer proliferation and aggressive potential: a molecular and clinicopathological study/ D. de Gonzalo-Calvo, L. Lopez-Vilaro, L. Nasarre, et al// *BMC Cancer*.-2015.-Vol.15; 460.
92. Lipid droplets in inflammation and cancer/ P.T. Bozza, J.P. Viola// *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*.-2010.-Vol.82; no.4-6.-P.243-50.
93. HIF2 α -Dependent Lipid Storage Promotes Endoplasmic Reticulum Homeostasis in Clear-Cell Renal Cell Carcinoma/ B. Qiu, D. Ackerman, D.J. Sanchez, et al// *Cancer Discov*.-2015.-Vol.5; no.6.-P.652-67.
94. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment/ D. Hanahan, L.M. Coussens// *Cancer Cell*.-2012.-Vol.21; no.3.-P.309-22.
95. Adipocytes promote ovarian cancer metastasis and provide energy for rapid tumor growth/ K.M. Nieman, H.A. Kenny, C.V. Penicka, et al// *Nat Med*.-2011.-Vol.17; no.11.-P.1498-503.
96. Direct evidence of lipid translocation between adipocytes and prostate cancer cells with imaging FTIR microspectroscopy/ E. Gazi, P. Gardner, N.P. Lockyer, et al// *J Lipid Res*.-2007.-Vol.48; no.8.-P.1846-56.
97. The Utilization of Extracellular Proteins as Nutrients Is Suppressed by mTORC1/ W. Palm, Y. Park, K. Wright, et al// *Cell*.-2015.-Vol.162; no.2.-P.259-70.

98. Macropinocytosis of protein is an amino acid supply route in Ras-transformed cells/ C. Commisso, S.M. Davidson, R.G. Soydaner-Azeloglu, et al.// *Nature*.-2013.-Vol.497; no.7451.-P.633-7.
99. Exosomes as new vesicular lipid transporters involved in cell-cell communication and various pathophysiological processes/ M. Record, K. Carayon, M. Poirot, et al.// *Biochim Biophys Acta*.-2014.-Vol.1841; no.1.-P.108-20.
100. Eicosanoids and cancer/ D. Wang, R.N. Dubois// *Nat Rev Cancer*.-2010.-Vol.10; no.3.-P.181-93.
101. Induction of myeloid-derived suppressor cells by tumor exosomes/ X. Xiang, A. Poliakov, C. Liu, et al.// *Int J Cancer*.-2009.-Vol.124; no.11.-P.2621-33.
102. M2 macrophages induced by prostaglandin E2 and IL-6 from cervical carcinoma are switched to activated M1 macrophages by CD4+ Th1 cells/ M. Heusinkveld, P.J. de Vos van Steenwijk, R. Goedemans, et al.// *J Immunol*.-2011.-Vol.187; no.3.-P.1157-65.
103. Role of prostaglandin E2-dependent angiogenic switch in cyclooxygenase 2-induced breast cancer progression/ S.H. Chang, C.H. Liu, R. Conway, et al.// *Proc Natl Acad Sci U S A*.-2004.-Vol.101; no.2.-P.591-6.
104. Prostaglandin E2 regulates cell migration via the intracellular activation of the epidermal growth factor receptor/ F.G. Buchanan, D. Wang, F. Bargiacchi, et al.// *J Biol Chem*.-2003.-Vol.278; no.37.-P.35451-7.
105. Cancer/stroma interplay via cyclooxygenase-2 and indoleamine 2,3-dioxygenase promotes breast cancer progression/ J.Y. Chen, C.F. Li, C.C. Kuo, et al.// *Breast Cancer Res*.-2014.-Vol.16; no.4.-P.410.
106. Validation of an anti-sphingosine-1-phosphate antibody as a potential therapeutic in reducing growth, invasion, and angiogenesis in multiple tumor lineages/ B. Visentin, J.A. Vekich, B.J. Sibbald, et al.// *Cancer Cell*.-2006.-Vol.9; no.3.-P.225-38.
107. Role of sphingosine kinase-1 in paracrine/transcellular angiogenesis and lymphangiogenesis in vitro/ V. Anelli, C.R. Gault, A.J. Snider, et al.// *FASEB J*.-2010.-Vol.24; no.8.-P.2727-38.
108. MapSplice: accurate mapping of RNA-seq reads for splice junction discovery/ K. Wang, D. Singh, Z. Zeng, et al.// *Nucleic Acids Res*.-2010.-Vol.38; no.18.-P.e178.
109. The microRNA spectrum in 12 body fluids/ J.A. Weber, D.H. Baxter, S. Zhang, et al.// *Clin Chem*.-2010.-Vol.56; no.11.-P.1733-41.
110. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma/ J.D. Arroyo, J.R. Chevillet, E.M. Kroh, et al.// *Proc Natl Acad Sci U S A*.-2011.-Vol.108; no.12.-P.5003-8.

111. Characterization of extracellular circulating microRNA/ A. Turchinovich, L. Weiz, A. Langheinz, et al.// *Nucleic Acids Res.*-2011.-Vol.39; no.16.-P.7223-33.
112. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins/ K.C. Vickers, B.T. Palmisano, B.M. Shoucri, et al.// *Nat Cell Biol.*-2011.-Vol.13; no.4.-P.423-33.
113. Unbiased approach to profile the variety of small non-coding RNA of human blood plasma with massively parallel sequencing technology/ D.V. Semenov, D.N. Baryakin, E.V. Brenner, et al.// *Expert Opin Biol Ther.*-2012.-Vol.12 Suppl 1; S43-51.
114. Cancer-secreted miR-105 destroys vascular endothelial barriers to promote metastasis/ W. Zhou, M.Y. Fong, Y. Min, et al.// *Cancer Cell.*-2014.-Vol.25; no.4.-P.501-15.
115. Leukemia cell to endothelial cell communication via exosomal miRNAs/ T. Umezu, K. Ohyashiki, M. Kuroda, et al.// *Oncogene.*-2013.-Vol.32; no.22.-P.2747-55.
116. Melanoma miRNA trafficking controls tumour primary niche formation/ S. Dror, L. Sander, H. Schwartz, et al.// *Nat Cell Biol.*-2016.-Vol.18; no.9.-P.1006-17.
117. Protein-free small nuclear RNAs catalyze a two-step splicing reaction/ S. Valadkhan, A. Mohammadi, Y. Jaladat, et al.// *Proc Natl Acad Sci U S A.*-2009.-Vol.106; no.29.-P.11901-6.
118. Targeted ribose methylation of RNA in vivo directed by tailored antisense RNA guides/ J. Cavaille, M. Nicoloso, J.P. Bachellerie// *Nature.*-1996.-Vol.383; no.6602.-P.732-5.
119. Minor introns are embedded molecular switches regulated by highly unstable U6atac snRNA/ I. Younis, K. Dittmar, W. Wang, et al.// *Elife.*-2013.-Vol.2; e00780.
120. Are snoRNAs and snoRNA host genes new players in cancer?/ G.T. Williams, F. Farzaneh// *Nat Rev Cancer.*-2012.-Vol.12; no.2.-P.84-8.
121. Small nucleolar RNA 42 acts as an oncogene in lung tumorigenesis/ Y.P. Mei, J.P. Liao, J. Shen, et al.// *Oncogene.*-2012.-Vol.31; no.22.-P.2794-804.
122. C/D-box snoRNA-derived RNA production is associated with malignant transformation and metastatic progression in prostate cancer/ E.S. Martens-Uzunova, Y. Hoogstrate, A. Kalsbeek, et al.// *Oncotarget.*-2015.-Vol.6; no.19.-P.17430-44.
123. Small nucleolar RNAs U32a, U33, and U35a are critical mediators of metabolic stress/ C.I. Michel, C.L. Holley, B.S. Scruggs, et al.// *Cell Metab.*-2011.-Vol.14; no.1.-P.33-44.
124. Cytosolic accumulation of small nucleolar RNAs (snoRNAs) is dynamically regulated by NADPH oxidase/ C.L. Holley, M.W. Li, B.S. Scruggs, et al.// *J Biol Chem.*-2015.-Vol.290; no.18.-P.11741-8.
125. Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles/ B. Gyorgy, T.G. Szabo, M. Pasztoi, et al.// *Cell Mol Life Sci.*-2011.-Vol.68; no.16.-P.2667-88.

126. Sumoylated hnRNPA2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific motifs/ C. Villarroya-Beltri, C. Gutierrez-Vazquez, F. Sanchez-Cabo, et al.// *Nat Commun.*-2013.-Vol.4; no.2980.-P.1-10.
127. Exosomes/microvesicles as a mechanism of cell-to-cell communication/ G. Camussi, M.C. Deregibus, S. Bruno, et al.// *Kidney Int.*-2010.-Vol.78; no.9.-P.838-48.
128. Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication/ S. Mathivanan, H. Ji, R.J. Simpson// *J Proteomics.*-2010.-Vol.73; no.10.-P.1907-20.
129. Exosomes and microvesicles: extracellular vesicles for genetic information transfer and gene therapy/ Y. Lee, S. El Andaloussi, M.J. Wood// *Hum Mol Genet.*-2012.-Vol.21; no.R1.-P.R125-34.
130. Endothelial microparticles in diseases/ G.N. Chironi, C.M. Boulanger, A. Simon, et al.// *Cell Tissue Res.*-2009.-Vol.335; no.1.-P.143-51.
131. Biogenesis of extracellular vesicles (EV): exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies/ J.C. Akers, D. Gonda, R. Kim, et al.// *J Neurooncol.*-2013.-Vol.113; no.1.-P.1-11.
132. A novel mechanism of generating extracellular vesicles during apoptosis via a beads-on-a-string membrane structure/ G.K. Atkin-Smith, R. Tixeira, S. Paone, et al.// *Nat Commun.*-2015.-Vol.6; 7439.
133. Extracellular Vesicles - Powerful Markers of Cancer EVolution/ J. Carvalho, C. Oliveira// *Front Immunol.*-2014.-Vol.5; no.685.-P.1-2.
134. Schwann cell to axon transfer of ribosomes: toward a novel understanding of the role of glia in the nervous system/ F.A. Court, W.T. Hendriks, H.D. MacGillavry, et al.// *J Neurosci.*-2008.-Vol.28; no.43.-P.11024-9.
135. In Vivo imaging reveals extracellular vesicle-mediated phenocopying of metastatic behavior/ A. Zomer, C. Maynard, F.J. Verweij, et al.// *Cell.*-2015.-Vol.161; no.5.-P.1046-57.
136. Microvesicles as mediators of intercellular communication in cancer/ M.A. Antonyak, R.A. Cerione// *Methods Mol Biol.*-2014.-Vol.1165; 147-73.
137. Extracellular vesicles from neural stem cells transfer IFN-gamma via Ifngr1 to activate Stat1 signaling in target cells/ C. Cossetti, N. Iraci, T.R. Mercer, et al.// *Mol Cell.*-2014.-Vol.56; no.2.-P.193-204.
138. Quantitative mass spectrometric multiple reaction monitoring assays for major plasma proteins/ L. Anderson, C.L. Hunter// *Mol Cell Proteomics.*-2006.-Vol.5; no.4.-P.573-88.
139. Mining the ovarian cancer ascites proteome for potential ovarian cancer biomarkers/ C. Kuk, V. Kulasingam, C.G. Gunawardana, et al.// *Mol Cell Proteomics.*-2009.-Vol.8; no.4.-P.661-9.

140. Comparison of different depletion strategies for improved resolution in proteomic analysis of human serum samples/ K. Bjorhall, T. Miliotis, P. Davidsson// *Proteomics*.-2005.-Vol.5; no.1.-P.307-17.
141. The art of observing rare protein species in proteomes with peptide ligand libraries/ E. Boschetti, P.G. Righetti// *Proteomics*.-2009.-Vol.9; no.6.-P.1492-510.
142. SELDI-TOF MS versus prostate specific antigen analysis of prospective plasma samples in a nested case-control study of prostate cancer/ A. Skytt, E. Thysell, P. Stattin, et al.// *Int J Cancer*.-2007.-Vol.121; no.3.-P.615-20.
143. Combination of SELDI-TOF-MS and data mining provides early-stage response prediction for rectal tumors undergoing multimodal neoadjuvant therapy/ F.M. Smith, W.M. Gallagher, E. Fox, et al.// *Ann Surg*.-2007.-Vol.245; no.2.-P.259-66.
144. Diagnosis of gastric cancer using decision tree classification of mass spectral data/ Y. Su, J. Shen, H. Qian, et al.// *Cancer Sci*.-2007.-Vol.98; no.1.-P.37-43.
145. Serum proteomic features for detection of endometrial cancer/ L.R. Zhu, W.Y. Zhang, L. Yu, et al.// *Int J Gynecol Cancer*.-2006.-Vol.16; no.3.-P.1374-8.
146. Reproducibility in protein profiling by MALDI-TOF mass spectrometry/ J. Albrethsen// *Clin Chem*.-2007.-Vol.53; no.5.-P.852-8.
147. Integrative proteomic analysis of serum and peritoneal fluids helps identify proteins that are up-regulated in serum of women with ovarian cancer/ L.M. Amon, W. Law, M.P. Fitzgibbon, et al.// *PLoS One*.-2010.-Vol.5; no.6.-P.e11137.
148. Precision proteomics: the case for high resolution and high mass accuracy/ M. Mann, N.L. Kelleher// *Proc Natl Acad Sci U S A*.-2008.-Vol.105; no.47.-P.18132-8.
149. SELDI-TOF MS whole serum proteomic profiling with IMAC surface does not reliably detect prostate cancer/ D. McLerran, W.E. Grizzle, Z. Feng, et al.// *Clin Chem*.-2008.-Vol.54; no.1.-P.53-60.
150. Romancing the "hidden proteome", Anno Domini two zero zero seven/ E. Boschetti, L. Lomas, A. Citterio, et al.// *J Chromatogr A*.-2007.-Vol.1153; no.1-2.-P.277-90.
151. Characterization of serum biomarkers for detection of early stage ovarian cancer/ K.R. Kozak, F. Su, J.P. Whitelegge, et al.// *Proteomics*.-2005.-Vol.5; no.17.-P.4589-96.
152. Recent advances in metabolomics in oncology/ T.M. O'Connell// *Bioanalysis*.-2012.-Vol.4; no.4.-P.431-51.
153. Applications of metabolomics in cancer research/ K.A. Vermeersch, M.P. Styczynski// *J Carcinog*.-2013.-Vol.12; 9.

154. Procedures for large-scale metabolic profiling of serum and plasma using gas chromatography and liquid chromatography coupled to mass spectrometry/ W.B. Dunn, D. Broadhurst, P. Begley, et al.// *Nat Protoc.*-2011.-Vol.6; no.7.-P.1060-83.
155. Rapid mass spectrometric metabolic profiling of blood sera detects ovarian cancer with high accuracy/ M. Zhou, W. Guan, L.D. Walker, et al.// *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*-2010.-Vol.19; no.9.-P.2262-71.
156. Detection of epithelial ovarian cancer using ¹H-NMR-based metabonomics/ K. Odunsi, R.M. Wollman, C.B. Ambrosone, et al.// *Int J Cancer.*-2005.-Vol.113; no.5.-P.782-8.
157. Identification of potential biomarkers for ovarian cancer by urinary metabolomic profiling/ T. Zhang, X. Wu, C. Ke, et al.// *J Proteome Res.*-2013.-Vol.12; no.1.-P.505-12.
158. Clinical applications of metabolomics in oncology: a review/ J.L. Spratlin, N.J. Serkova, S.G. Eckhardt// *Clin Cancer Res.*-2009.-Vol.15; no.2.-P.431-40.
159. Mass spectrometry-based metabolomics/ K. Dettmer, P.A. Aronov, B.D. Hammock// *Mass Spectrom Rev.*-2007.-Vol.26; no.1.-P.51-78.
160. Review of mass spectrometry-based metabolomics in cancer research/ D.B. Liesenfeld, N. Habermann, R.W. Owen, et al.// *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*-2013.-Vol.22; no.12.-P.2182-201.
161. Implementation of proteomics for cancer research: past, present, and future/ P. Karimi, A. Shahrokni, M.R. Ranjbar// *Asian Pac J Cancer Prev.*-2014.-Vol.15; no.6.-P.2433-8.
162. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids/ C. Thery, S. Amigorena, G. Raposo, et al.// *Curr Protoc Cell Biol.*-2006.-Vol.Chapter 3; Unit 3 22.
163. Quantitative nuclear proteomics identifies mTOR regulation of DNA damage response/ S. Bandhakavi, Y.M. Kim, S.H. Ro, et al.// *Mol Cell Proteomics.*-2010.-Vol.9; no.2.-P.403-14.
164. Exploring RNA transcription and turnover in vivo by using click chemistry/ C.Y. Jao, A. Salic// *Proc Natl Acad Sci U S A.*-2008.-Vol.105; no.41.-P.15779-84.
165. Quantitative proteomic analysis of single or fractionated radiation-induced proteins in human breast cancer MDA-MB-231 cells/ M.H. Kim, S.Y. Jung, J. Ahn, et al.// *Cell Biosci.*-2015.-Vol.5; 2.
166. Unique proteome signature of post-chemotherapy ovarian cancer ascites-derived tumor cells/ N. Ahmed, D. Greening, C. Samardzija, et al.// *Sci Rep.*-2016.-Vol.6; 30061.
167. Changes in the serum protein composition in mice with transplanted Ehrlich's carcinoma/ N.G. Kormosh, R. Ziganshin, V.O. Shender, et al.// *Bull Exp Biol Med.*-2015.-Vol.158; no.4.-P.489-92.

168. Meeting the challenge of ascites in ovarian cancer: new avenues for therapy and research/ E. Kipps, D.S. Tan, S.B. Kaye// *Nat Rev Cancer*.-2013.-Vol.13; no.4.-P.273-82.
169. Cancer cell metabolism: implications for therapeutic targets/ M. Jang, S.S. Kim, J. Lee// *Exp Mol Med*.-2013.-Vol.45; e45.
170. Transglutaminase 2 reprogramming of glucose metabolism in mammary epithelial cells via activation of inflammatory signaling pathways/ S. Kumar, T.R. Donti, N. Agnihotri, et al.// *Int J Cancer*.-2014.-Vol.134; no.12.-P.2798-807.
171. Cellular fatty acid metabolism and cancer/ E. Currie, A. Schulze, R. Zechner, et al.// *Cell Metab*.-2013.-Vol.18; no.2.-P.153-61.
172. Lipid metabolism in cancer/ C.R. Santos, A. Schulze// *FEBS J*.-2012.-Vol.279; no.15.-P.2610-23.
173. Long chain ceramides and very long chain ceramides have opposite effects on human breast and colon cancer cell growth/ D. Hartmann, J. Lucks, S. Fuchs, et al.// *Int J Biochem Cell Biol*.-2012.-Vol.44; no.4.-P.620-8.
174. Lysophosphatidic acid inhibits CD8 T cell activation and control of tumor progression/ S.K. Oda, P. Strauch, Y. Fujiwara, et al.// *Cancer Immunol Res*.-2013.-Vol.1; no.4.-P.245-55.
175. Extracellular lipid metabolism influences the survival of ovarian cancer cells/ S. Kuwata, K. Ohkubo, S. Kumamoto, et al.// *Biochem Biophys Res Commun*.-2013.-Vol.439; no.2.-P.280-4.
176. The emerging role of lysophosphatidic acid in cancer/ G.B. Mills, W.H. Moolenaar// *Nat Rev Cancer*.-2003.-Vol.3; no.8.-P.582-91.
177. The human plasma proteome: a nonredundant list developed by combination of four separate sources/ N.L. Anderson, M. Polanski, R. Pieper, et al.// *Mol Cell Proteomics*.-2004.-Vol.3; no.4.-P.311-26.
178. The Pathogenesis of the Demyelinating Form of Guillain-Barre Syndrome (GBS): Proteo-peptidomic and Immunological Profiling of Physiological Fluids/ R.H. Ziganshin, O.M. Ivanova, Y.A. Lomakin, et al.// *Mol Cell Proteomics*.-2016.-Vol.15; no.7.-P.2366-78.
179. Изучение протективного внеклеточного протеома *Staphylococcus Aureus* №6/ И.М. Грубер, Ф.В. Доненко, Е.А. Асташкина, et al.// *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*.-2015.-Vol.6 (85); 87-94.
180. Secretion of extracellular hsp90alpha via exosomes increases cancer cell motility: a role for plasminogen activation/ J. McCreedy, J.D. Sims, D. Chan, et al.// *BMC Cancer*.-2010.-Vol.10; 294.
181. The spliceosomal proteome: at the heart of the largest cellular ribonucleoprotein machine/ S. Valadkhan, Y. Jaladat// *Proteomics*.-2010.-Vol.10; no.22.-P.4128-41.

182. In-depth exploration of cerebrospinal fluid by combining peptide ligand library treatment and label-free protein quantification/ E. Mouton-Barbosa, F. Roux-Dalvai, D. Bouyssie, et al.// *Mol Cell Proteomics*.-2010.-Vol.9; no.5.-P.1006-21.
183. Extensive analysis of the cytoplasmic proteome of human erythrocytes using the peptide ligand library technology and advanced mass spectrometry/ F. Roux-Dalvai, A. Gonzalez de Peredo, C. Simo, et al.// *Mol Cell Proteomics*.-2008.-Vol.7; no.11.-P.2254-69.
184. Regulation of splicing by SR proteins and SR protein-specific kinases/ Z. Zhou, X.D. Fu// *Chromosoma*.-2013.-Vol.122; no.3.-P.191-207.
185. Defects in spliceosomal machinery: a new pathway of leukaemogenesis/ J.P. Maciejewski, R.A. Padgett// *Br J Haematol*.-2012.-Vol.158; no.2.-P.165-73.
186. Widespread intron retention diversifies most cancer transcriptomes/ H. Dvinge, R.K. Bradley// *Genome Med*.-2015.-Vol.7; no.1.-P.45.
187. Multiple components of the spliceosome regulate Mcl1 activity in neuroblastoma/ T.W. Laetsch, X. Liu, A. Vu, et al.// *Cell Death Dis*.-2014.-Vol.5; e1072.
188. The spliceosome as a target of novel antitumour drugs/ S. Bonnal, L. Vigevani, J. Valcarcel// *Nat Rev Drug Discov*.-2012.-Vol.11; no.11.-P.847-59.
189. RNA splicing factors as oncoproteins and tumour suppressors/ H. Dvinge, E. Kim, O. Abdel-Wahab, et al.// *Nat Rev Cancer*.-2016.-Vol.16; no.7.-P.413-30.
190. Оценка уровней цитокинов в асцитической жидкости при раке яичников на фоне неoadьювантной химиотерапии/ О.И. Алешикова, И.Б. Антонова, Е.В. Бабаева, et al.// *Доктор.Пу.*-2018.-Vol.№2(146); 63-68.
191. The 20S proteasome core, active within apoptotic exosome-like vesicles, induces autoantibody production and accelerates rejection/ M. Dieude, C. Bell, J. Turgeon, et al.// *Sci Transl Med*.-2015.-Vol.7; no.318.-P.318-200.
192. The prognostic impact of circulating proteasome concentrations in patients with epithelial ovarian cancer/ M. Heubner, P. Wimberger, B. Dahlmann, et al.// *Gynecol Oncol*.-2011.-Vol.120; no.2.-P.233-8.
193. Diagnostic value and prognostic significance of plasmatic proteasome level in patients with melanoma/ L. Henry, T. Lavabre-Bertrand, T. Douche, et al.// *Exp Dermatol*.-2010.-Vol.19; no.12.-P.1054-9.
194. Large-scale proteomic analysis of the human spliceosome/ J. Rappsilber, U. Ryder, A.I. Lamond, et al.// *Genome Res*.-2002.-Vol.12; no.8.-P.1231-45.
195. Protein-free spliceosomal snRNAs catalyze a reaction that resembles the first step of splicing/ S. Valadkhan, A. Mohammadi, C. Wachtel, et al.// *RNA*.-2007.-Vol.13; no.12.-P.2300-11.

196. Splicing Regulation: A Molecular Device to Enhance Cancer Cell Adaptation/ V. Pagliarini, C. Naro, C. Sette// *Biomed Res Int.*-2015.-Vol.2015; 543067.
197. Extracellular small RNAs: what, where, why?/ A.M. Hoy, A.H. Buck// *Biochem Soc Trans.*-2012.-Vol.40; no.4.-P.886-90.
198. Export of microRNAs and microRNA-protective protein by mammalian cells/ K. Wang, S. Zhang, J. Weber, et al.// *Nucleic Acids Res.*-2010.-Vol.38; no.20.-P.7248-59.
199. MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer/ D.D. Taylor, C. Gercel-Taylor// *Gynecol Oncol.*-2008.-Vol.110; no.1.-P.13-21.
200. Determination of a Comprehensive Alternative Splicing Regulatory Network and Combinatorial Regulation by Key Factors during the Epithelial-to-Mesenchymal Transition/ Y. Yang, J.W. Park, T.W. Bebee, et al.// *Mol Cell Biol.*-2016.-Vol.36; no.11.-P.1704-19.
201. Making alternative splicing decisions during epithelial-to-mesenchymal transition (EMT)/ G. Biamonti, S. Bonomi, S. Gallo, et al.// *Cell Mol Life Sci.*-2012.-Vol.69; no.15.-P.2515-26.
202. An EMT-driven alternative splicing program occurs in human breast cancer and modulates cellular phenotype/ I.M. Shapiro, A.W. Cheng, N.C. Flytzanis, et al.// *PLoS Genet.*-2011.-Vol.7; no.8.-P.e1002218.
203. Compensatory proliferation and apoptosis-induced proliferation: a need for clarification/ B. Mollereau, A. Perez-Garijo, A. Bergmann, et al.// *Cell Death Differ.*-2013.-Vol.20; no.1.-P.181.
204. Mechanisms of alternative splicing regulation: insights from molecular and genomics approaches/ M. Chen, J.L. Manley// *Nat Rev Mol Cell Biol.*-2009.-Vol.10; no.11.-P.741-54.
205. Targeting the deregulated spliceosome core machinery in cancer cells triggers mTOR blockade and autophagy/ V. Quidville, S. Alsafadi, A. Goubar, et al.// *Cancer Res.*-2013.-Vol.73; no.7.-P.2247-58.
206. Serum-nutrient starvation induces cell death mediated by Bax and Puma that is counteracted by p21 and unmasked by Bcl-x(L) inhibition/ F. Braun, J. Bertin-Ciftci, A.S. Gallouet, et al.// *PLoS One.*-2011.-Vol.6; no.8.-P.e23577.
207. Microarray-based detection and expression analysis of new genes associated with drug resistance in ovarian cancer cell lines/ R. Januchowski, K. Sterzynska, P. Zawierucha, et al.// *Oncotarget.*-2017.-Vol.8; no.30.-P.49944-49958.
208. The core spliceosome as target and effector of non-canonical ATM signalling/ M. Tresini, D.O. Warmerdam, P. Kolovos, et al.// *Nature.*-2015.-Vol.523; no.7558.-P.53-8.
209. Genotoxic stress causes the accumulation of the splicing regulator Sam68 in nuclear foci of transcriptionally active chromatin/ R. Busa, R. Geremia, C. Sette// *Nucleic Acids Res.*-2010.-Vol.38; no.9.-P.3005-18.

210. Circulating U2 small nuclear RNA fragments as a novel diagnostic biomarker for primary central nervous system lymphoma/ A. Baraniskin, E. Zaslavskaya, S. Nopel-Dunnebacke, et al.// *Neuro Oncol.*-2016.-Vol.18; no.3.-P.361-7.
211. A small noncoding RNA signature found in exosomes of GBM patient serum as a diagnostic tool/ L. Manterola, E. Guruceaga, J. Gallego Perez-Larraya, et al.// *Neuro Oncol.*-2014.-Vol.16; no.4.-P.520-7.
212. Circulating U2 small nuclear RNA fragments as a novel diagnostic tool for patients with epithelial ovarian cancer/ J.D. Kuhlmann, A. Baraniskin, S.A. Hahn, et al.// *Clin Chem.*-2014.-Vol.60; no.1.-P.206-13.
213. Characterization of human plasma-derived exosomal RNAs by deep sequencing/ X. Huang, T. Yuan, M. Tschannen, et al.// *BMC Genomics.*-2013.-Vol.14; 319.
214. Nucleotide sequences and modifications that determine RIG-I/RNA binding and signaling activities/ D. Uzri, L. Gehrke// *J Virol.*-2009.-Vol.83; no.9.-P.4174-84.
215. Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA/ L. Warren, P.D. Manos, T. Ahfeldt, et al.// *Cell Stem Cell.*-2010.-Vol.7; no.5.-P.618-30.
216. Non-coding RNAs: lessons from the small nuclear and small nucleolar RNAs/ A.G. Matera, R.M. Terns, M.P. Terns// *Nat Rev Mol Cell Biol.*-2007.-Vol.8; no.3.-P.209-20.
217. The translational landscape of the splicing factor SRSF1 and its role in mitosis/ M.M. Maslon, S.R. Heras, N. Bellora, et al.// *Elife.*-2014.-Vol.e02028.
218. Graded requirement for the spliceosome in cell cycle progression/ Z. Karamysheva, L.A. Diaz-Martinez, R. Warrington, et al.// *Cell Cycle.*-2015.-Vol.14; no.12.-P.1873-83.
219. SNW1 enables sister chromatid cohesion by mediating the splicing of sororin and APC2 pre-mRNAs/ P. van der Lelij, R.R. Stocsits, R. Ladurner, et al.// *EMBO J.*-2014.-Vol.33; no.22.-P.2643-58.
220. Functional genomics identifies a requirement of pre-mRNA splicing factors for sister chromatid cohesion/ S. Sundaramoorthy, M.D. Vazquez-Novelle, S. Lekomtsev, et al.// *EMBO J.*-2014.-Vol.33; no.22.-P.2623-42.
221. SON is a spliceosome-associated factor required for mitotic progression/ M.S. Huen, S.M. Sy, K.M. Leung, et al.// *Cell Cycle.*-2010.-Vol.9; no.13.-P.2679-85.
222. Spliceosomal protein E regulates neoplastic cell growth by modulating expression of cyclin E/CDK2 and G2/M checkpoint proteins/ Z. Li, B.M. Putzer// *J Cell Mol Med.*-2008.-Vol.12; no.6A.-P.2427-38.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

Сравнение протеомных данных нашего исследования со списком потенциальных маркеров рака яичников, который был сгенерирован на основе анализа литературных данных Kuk et al. [139].

Известные биомаркеры	ID Uniprot	Циррозные асциты	Опухолевые асциты
72 kDa type IV collagenase (MMP2)	P08253	+	+
Afamin (AFM)	P43652	+	+
Alpha-2-antiplasmin (SERPINF2)	P08697	+	+
Anti-mucin1 light chain variable region (Fragment)	A2JA16	+	+
Anti-mucin1 light chain variable region (Fragment)	A2JA19	+	+
Anti-mucin1 light chain variable region (Fragment)	A2JA15	-	+
Alpha-1-antichymotrypsin (SERPINA3)	P01011	+	+
Phosphatidylethanolamine-binding protein 1 (PEBP1)	P30086	+	+
highly similar to Serotransferrin	B4E1B2	+	+
Metalloproteinase inhibitor 1 (TIMP1)	P01033	+	+
Plasminogen activator inhibitor 1 (SERPINE1)	P05121	+	+
Chitinase-3-like protein 1 (CHI3L1)	P36222	+	+
Galectin-1 (LGALS1)	P09382	+	+
Insulin-like growth factor-binding protein 2 (IGFBP2)	P18065	+	+
Insulin-like growth factor-binding protein 3 (IGFBP3)	P17936	+	+
Insulin-like growth factor-binding protein 6 (IGFBP6)	P24592	+	+
Isoform 2 of Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4 (ITI4)	Q14624	-	+
Kallikrein-10 (KLK10)	O43240	-	+
Kallikrein-11 (KLK11)	Q9UBX7	-	-
Kallikrein-6 (KLK6)	Q92876	-	+
Kallikrein-7 (KLK7)	P49862	-	+
Kallikrein-8 (KLK8)	O60259	-	-
Kallikrein-9 (KLK9)	Q9UKQ9	-	-
Lutheran blood group glycoprotein	A9LST5	-	-
Macrophage colony-stimulating factor 1 (CSF1)	P09603	-	+
Metalloproteinase inhibitor 2 (TIMP2)	P16035	+	+
Mucin-1 (MUC1)	P15941	-	+
Mucin-16 (CA125)	Q8WXI7	-	-
Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (LCN2)	P80188	+	+
Osteopontin (SPP1)	P10451	+	+
Prostasin (PRSS8)	Q16651	-	+
Retinol-binding protein 4 (RBP4)	P02753	+	+
Serotransferrin (TF)	P02787	+	+
Sex hormone-binding globulin (SHBG)	P04278	+	+
Tetranectin (CLEC3B)	P05452	+	+
Thrombospondin-1	P07996	-	+
Transthyretin (TTR)	P02766	+	+
Urokinase plasminogen activator surface receptor	Q03405	-	-
WAP four-disulfide core domain protein 2 (HE4)	Q14508	-	-
Общее количество белков:	39	23	32

ПРИЛОЖЕНИЕ 2

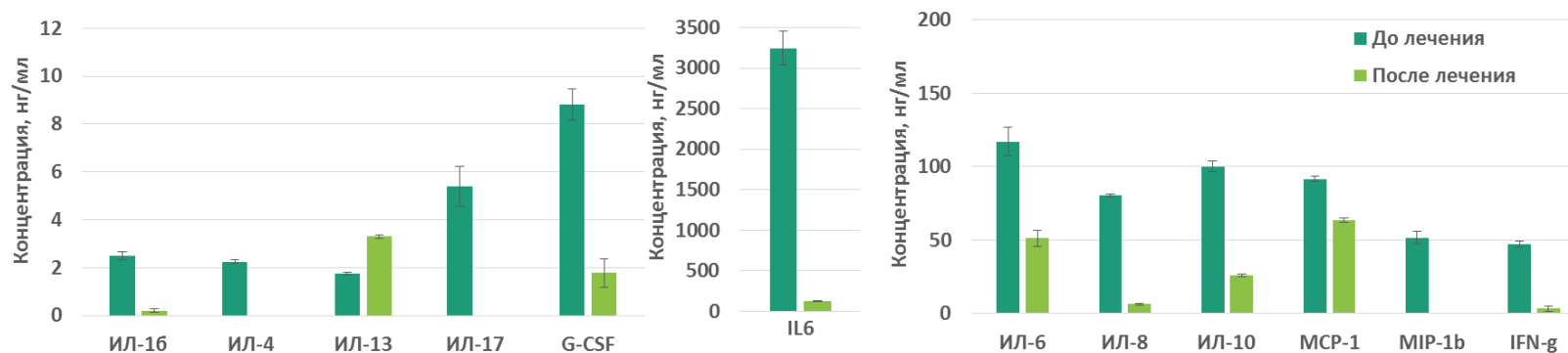
Первые 20 наиболее статистически значимых ($p < 0,05$) кластеров белков, дифференциально повышенных в образцах опухолевых асцитов по сравнению с асцитами от пациенток с циррозом. Данные обогащения получены с использованием базы данных Генной онтологии Биологические процессы (GO Biological Processes). **Полужирным** шрифтом выделены пути, относящиеся к процессу сплайсинга.

GO термин	Название пути	Количество генов в пути	FDR
GO.0016071	mRNA metabolic process	75	1,56E-23
GO.0044403	symbiosis, encompassing mutualism through parasitism	82	5,79E-20
GO.0006412	translation	53	1,22E-19
GO.0044764	multi-organism cellular process	77	1,22E-19
GO.0043043	peptide biosynthetic process	54	2,25E-19
GO.0043933	macromolecular complex subunit organization	142	2,25E-19
GO.0016032	viral process	76	2,31E-19
GO.0010608	posttranscriptional regulation of gene expression	52	5,56E-19
GO.0006518	peptide metabolic process	59	5,81E-19
GO.0000375	RNA splicing, via transesterification reactions	42	7,70E-19
GO.0071840	cellular component organization or biogenesis	241	9,57E-19
GO.0043604	amide biosynthetic process	57	1,32E-18
GO.0000398	mRNA splicing, via spliceosome	41	2,60E-18
GO.0044265	cellular macromolecule catabolic process	77	3,18E-18
GO.0016043	cellular component organization	235	3,67E-18
GO.0009057	macromolecule catabolic process	83	1,39E-17
GO.0006417	regulation of translation	45	2,29E-17
GO.0008380	RNA splicing	49	2,87E-17
GO.0022618	ribonucleoprotein complex assembly	34	2,96E-17
GO.0043603	cellular amide metabolic process	64	3,00E-16

ПРИЛОЖЕНИЕ 3

Результаты цитокинового профилирования асцитов. Верхняя панель: Средняя концентрация цитокинов (нг/мл) в асцитах пациенток с аденокарциномой яичника до и после неoadъювантной химиотерапии. Уровни цитокинов в асцитах до и после химиотерапии значительно отличались ($p \leq 0,05$). Нижняя панель: Динамика уровня цитокинов на фоне химиотерапии.

Цитокины/ Средняя концентрация цитокинов нг/мл	IL-1b	IL-4	IL-6	IL-8	IL-10	IL-13	IL-17	G-CSF	IFN-g	MIP-1b	MCAF	TNF-a
До химиотерапии	2,5±0,17	2,25±0,08	3244,28±207,00	117,15±9,47	80,33±0,84	1,75±0,07	5,40±0,84	8,81±0,65	51,59±4,20	91,6±1,73	100,14±3,54	47,3±2,12
После химиотерапии	0,2±0,08	-	124,17±5,27	51,18±5,51	6,29±0,48	3,30±0,07	-	1,77±0,61	-	63,8±1,51	26,06±0,78	3,48±1,82



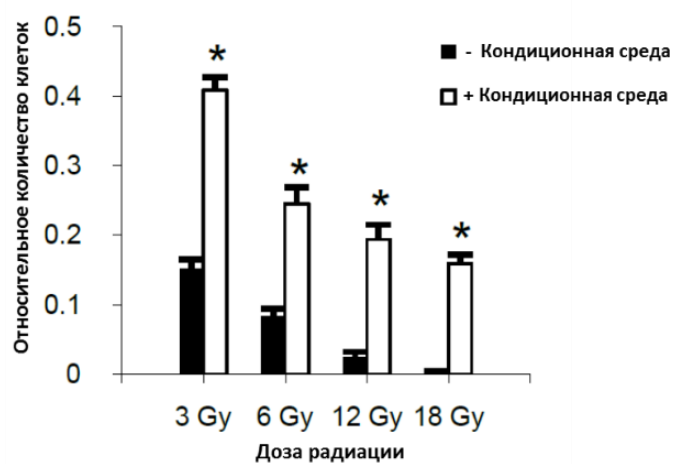
ПРИЛОЖЕНИЕ 4

Первые 20 наиболее статистически значимых ($p < 0,05$) кластеров белков, дифференциально повышенных в образцах опухолевых асцитов после курса неoadъювантной химиотерапии относительно опухолевых асцитов до лечения. Данные обогащения получены с использованием базы данных Генной онтологии Биологические процессы (GO Biological Processes). **Полужирным** шрифтом выделены пути, относящиеся к процессу сплайсинга.

GO термин	Название пути	Количество генов в пути	FDR
GO:0000398	mRNA splicing, via spliceosome	47	2,80E-30
GO:0048010	vascular endothelial growth factor receptor signaling pathway	39	9,00E-29
GO:0038179	neurotrophin signaling pathway	42	3,30E-28
GO:0009611	response to wounding	78	1,00E-27
GO:0072431	signal transduction involved in mitotic G1 DNA damage checkpoint	22	6,30E-27
GO:0051437	positive regulation of ubiquitin-protein ligase activity involved in regulation of mitotic cell cycle transition	22	1,90E-26
GO:0002220	innate immune response activating cell surface receptor signaling pathway	26	2,10E-26
GO:0006521	regulation of cellular amino acid metabolic process	23	3,70E-26
GO:0006595	polyamine metabolic process	25	1,10E-25
GO:0031397	negative regulation of protein ubiquitination	27	1,20E-25
GO:0044344	cellular response to fibroblast growth factor stimulus	38	1,50E-25
GO:0038061	NIK/NF-kappaB signaling	26	4,70E-25
GO:0032869	cellular response to insulin stimulus	40	1,10E-24
GO:0015031	protein transport	183	2,10E-24
GO:0006417	regulation of translation	43	2,80E-24
GO:0007599	hemostasis	49	3,40E-24
GO:0031145	anaphase-promoting complex-dependent catabolic process	22	3,60E-24
GO:0030177	positive regulation of Wnt signaling pathway	27	2,00E-23
GO:0045087	innate immune response	101	2,40E-23
GO:0038095	Fc-epsilon receptor signaling pathway	39	3,30E-23
GO:0022613	ribonucleoprotein complex biogenesis	51	4,80E-23

ПРИЛОЖЕНИЕ 5

Выживаемость реципиентных клеток глиобластомы, преикубированных в течение 3 дней с и без кондиционных сред и обработанных разными дозами радиации. Представлено среднее значение МТТ-индекса относительно контрольных необработанных кондиционными средами клеток \pm стандартное отклонение, рассчитанное по данным шести измерений. *p-value<0,01 по тесту Стьюдента.



ПРИЛОЖЕНИЕ 6

Перечень сплайсосомных белков, идентифицированных в секрете клеток SKOV3 после обработки цисплатином, по данным KEGG и GO.

ACIN1	NOL3	SNRPD2
ALYREF	NONO	SNRPD3
BCAS2	NUDT21	SNRPE
BUD31	PABPC1	SNRPF
C22orf28	PABPN1	SNW1
CACTIN	PCBP1	SON
CASC3	PCBP2	SREK1
CCAR1	PHAX	SRRM1
CD2BP2	PHF5A	SRRM2
CDC5L	PLRG1	SRSF1
CLNS1A	POLR2F	SRSF10
CPSF7	POLR2J	SRSF11
CSTF1	PPIE	SRSF2
CSTF2	PPIH	SRSF4
CSTF3	PPIL1	SRSF6
CWC27	PPIL3	SRSF7
DCPS	PPP1R8	STRAP
DDX46	PPP2R1A	TARDBP
DHX38	PPP4R2	THOC7
DNAJC8	PPWD1	THRAP3
EFTUD2	PQBP1	TRA2A
EIF4A3	PRMT5	TRA2B
GEMIN5	PRPF19	U2AF2
GTF2F1	PSIP1	UBL5
GTF2F2	PUF60	UPF3B
HNRNPA2B1	RALY	WDR77
HNRNPC	RBM10	WTAP
HNRNPD	RBM17	YBX1
HNRNPF	RBM22	ZCCHC8
HNRNPH2	RBM25	ZNF259
HNRNPK	RBM39	ZNF326
HNRNPL	RBM5	ZNF638
HNRNPM	SART1	CCDC12
HNRNPR	SART3	CHERP
HSPA8	SF1	DDX42
ISY1	SF3A1	DHX16
IWS1	SF3A2	HSPA1A
KHSRP	SF3A3	HSPA2
LGALS3	SF3B1	HSPA6
LSM1	SF3B2	LSM2
LSM3	SF3B5	RBM8A
LSM4	SMN1	SF3B4
LSM5	SNRNP200	SNRPG
LSM7	SNRPA	TCERG1
MAGOH	SNRPA1	
NAA38	SNRPB	
NHP2L1	SNRPC	

ПРИЛОЖЕНИЕ 7

Первые 9 наиболее статистически значимых ($p < 0,05$) кластеров пересекающихся белков, которые были дифференциально повышены в образцах опухолевых асцитов и в секретах клеточной линии рака яичника SKOV3 после химиотерапии. Данные обогащения получены с использованием базы данных KEGG. **Полужирным** шрифтом выделены пути, относящиеся к процессу сплайсинга.

Путь	Название пути	Количество генов в пути	FDR	Гены, входящие в кластер
hsa03010	Ribosome	20	3,45E-07	6206/3921/6227/6125/6189/ 6152/6146/6217/6187/6208/6202/ 6224/6194/6130/6205/6204/6133/ 6203/6159/6134
hsa03050	Proteasome	11	1,05E-06	5682/5720/5705/5701/5713/5717/9861/5700/ 5710/9491/11047
hsa03040	Spliceosome	16	1,69E-05	3312/4670/5093/9775/23658/6637/6426/27339/ 51691/3306/27258/57819/6636/4809/29896/6627
hsa05169	Epstein-Barr virus infection	19	3,85E-05	3312/7531/7532/7534/10971/5901/5705 /5701/3315/5713/5717/9861/3306/7529/7533/ 5700/5710/11047/7514
hsa05130	Pathogenic Escherichia coli infection	10	3,85E-05	7430/7534/4691/10971/3875/387/ 10382/10381/998/3688
hsa03013	RNA transport	17	4,95E-05	26986/8666/5901/1983/1965/8662/8669/9775/ 8664/8894/10605/1917/11171/8668/6396/7514/10419
hsa04144	Endocytosis	18	3,06E-03	3312/830/387/3306/9146/998/160/6642/10938/ 128866/58533/51100/56904/30846/1785/377/9525/1173
hsa04141	Protein processing in endoplasmic reticulum	12	2,55E-02	3312/5887/5886/6500/55968/1965/3306/ 29978/6238/3301/6396/6185
hsa04110	Cell cycle	9	8,11E-02	7531/7532/7534/10971/6500/7529/7533/2810/4172