

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки

ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ

им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова

Российской академии наук

на правах рукописи

Павлюков Марат Самвелович

**РОЛЬ АПОПТОЗА В ТРАНСФОРМАЦИИ ОПУХОЛЕЙ: НОВЫЕ
ПОДХОДЫ К ТЕРАПИИ ГЛИОМ**

Специальность 03.01.03 – молекулярная биология

Автореферат диссертации на соискание учёной степени

доктора биологических наук

Москва – 2019

Работа выполнена в лаборатории мембранных биоэнергетических систем Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук

Официальные оппоненты: **член-корреспондент РАН, профессор, д. б. н. Купраш Дмитрий Владимирович**, г. н. с. лаборатории передачи внутриклеточных сигналов в норме и патологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта Российской академии наук

профессор, д. б. н. Бабаков Алексей Владимирович, г. н. с. лаборатории стрессоустойчивости растений Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии»

профессор, д. б. н. Сащенко Лидия Павловна, заведующая лабораторией молекулярной иммуногенетики рака Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биологии гена Российской академии наук

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии Российской академии наук

Защита состоится 19 июня 2019 г. в 10:00 на заседании диссертационного совета Д002.019.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук по адресу 117997, Москва, ул. Миклухо-Макляя, 16/10.

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

Автореферат разослан ____ _____ 2019 г.

Учёный секретарь диссертационного совета,
доктор физико-математических наук



В.А. Олейников

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы.

В организме здорового человека ежедневно погибает более 50 миллиардов клеток, за год масса гибнущих клеток превышает вес всего человеческого тела. Такое элиминирование ненужных или повреждённых клеток является неотъемлемой частью функционирования большинства многоклеточных организмов, однако в зависимости от ткани продолжительность жизни отдельных клеток может варьировать от нескольких дней до десятков лет. В ходе эволюции возникли сложные молекулярные механизмы, позволяющие тонко регулировать процесс гибели клетки и его связь с пролиферацией соседних тканей, поддерживающей клеточный гомеостаз. Один из таких механизмов запрограммированной смерти клеток получил название апоптоз.

Исследования апоптоза являются важной задачей, тесно связанной с современной медициной. Так, ингибирование некоторых путей апоптоза позволяет предотвратить гибель нормальных клеток при инфарктах и инсультах и добиться почти полного восстановления организма после ишемических повреждений. С другой стороны, действие большинства противоопухолевых препаратов основано на индукции апоптоза в раковых клетках. Интенсивнейшие исследования в этой области привели к разработке тысяч низкомолекулярных соединений, предназначенных для активации запрограммированной клеточной гибели в опухолях. Однако, до недавнего времени все подобные работы были нацелены исключительно на поиск молекул, способных с максимальной эффективностью вызывать гибель большинства раковых клеток, и мало кто задавался вопросом «а что же происходит с опухолью после индукции апоптоза?».

Чтобы ответить на этот вопрос необходимо понимать, что апоптоз это нормальный процесс, происходящий в той или иной степени почти во всех тканях организма, и конечной целью этого процесса является не уничтожение отдельных клеток, а восстановление нормального функционирования повреждённой ткани. В соответствии с этим утверждением многими авторами было показано, что апоптотические клетки способны секретировать молекулы, ускоряющие пролиферацию и миграцию соседних клеток. Аналогичная ситуация, по-видимому, происходит и в опухолях.

На сегодняшний день не вызывает сомнений, что раковые опухоли представляют собой сложную тканеподобную систему, постоянно изменяющуюся во времени. Механизмы эволюции злокачественных новообразований исследованы крайне мало, однако, именно они лежат в основе возникновения резистентности к терапии. Последние данные свидетельствуют в пользу того, что один из механизмов эволюции опухолей основан на сигналах, продуцируемых апоптотическими клетками. Так, было показано, что гибнущие под действием терапии раковые клетки секретируют молекулы, вызывающие изменение фенотипа соседних, выживших, опухолевых клеток и повышающие их устойчивость к разнообразным методам лечения. Ингибирование этих сигналов могло бы существенно увеличить эффективность стандартных методов химио- и радиотерапии.

Очевидно, что роль межклеточных сигналов в разных типах новообразований различна. Так, в случае гематологических опухолей эффект от коммуникации между раковыми клетками минимален, в то время как для солидных опухолей значение этих сигналов может быть намного выше. Как пример рака, в эволюции которого межклеточные сигналы, по-видимому, играют ключевую роль можно привести глиобластому. Глиобластома – наиболее частая и наиболее агрессивная первичная опухоль головного мозга. Это один из немногих типов рака, для которых за последние 30 лет не было достигнуто никого значимого прогресса в лечении. До сих пор пятилетняя выживаемость пациентов с этим заболеванием не превышает 5%, а средний срок жизни составляет 14 месяцев. Таким образом, актуальность разработки новых методов терапии глиобластомы не вызывает сомнений.

Особенностью глиобластомы является то, что её клетки формируются и существуют в условиях крайне ограниченного пространства для роста, отсутствия хорошего кровоснабжения и, как следствие, постоянного недостатка кислорода и питательных веществ. Все это приводит к тому, что большую часть объёма опухоли часто занимает обширная некротическая зона, содержащая множество апоптотирующих клеток. О влиянии этих клеток на соседние опухолевые клетки ничего не известно, однако есть данные о том, что в ходе развития заболевания клетки глиобластомы переходят из менее агрессивного пронейронального фенотипа в более агрессивный и устойчивый к терапии мезенхимальный фенотип. Такой переход дополнительно ускоряется в случае применения радиотерапии. О причинах и механизмах пронейронально-мезенхимального перехода также известно крайне мало, однако понятно, что ингибирование этого процесса могло бы существенно повысить выживаемость пациентов с этим страшным заболеванием.

Настоящая работа посвящена исследованию молекулярных механизмов апоптоза, изучению роли апоптоза в межклеточной коммуникации и эволюции опухолей, созданию новых низкомолекулярных соединений, убивающих наиболее агрессивные популяции клеток глиобластомы *in vitro* и *in vivo*, и, наконец, разработке нового метода для визуализации внутриклеточного распределения лекарственных препаратов.

Цели и задачи исследования.

Целью данной работы являлось изучение роли апоптоза в эволюции и прогрессии злокачественных новообразований, а также создание нового типа противораковых препаратов, механизм действия которых позволил бы минимизировать возможность вторичного роста опухоли после терапии.

Для достижения заявленной цели были поставлены и решены следующие экспериментальные задачи:

1. Исследовать молекулярный механизм действия белков, принимающих ключевую роль в регуляции различных стадий апоптоза опухолевых клеток (AIF, Сурвивина, Smac/DIABLO, Параоксонозы 2 и Трансглутаминазы 2).
2. Изучить межклеточные сигналы, продуцируемые опухолевыми клетками, подвергающимися апоптозу под действием химио- и радиотерапии.

3. Определить, как молекулы, секретлируемые апоптотическими клетками, влияют на выжившие опухолевые клетки.
4. Исследовать молекулярный механизм действия секретомов апоптотических опухолевых клеток на реципиентные клетки.
5. Основываясь на полученных данных, создать новые соединения, направленно убивающие наиболее агрессивные популяции клеток глиобластомы.
6. Разработать метод, позволяющий оценивать эффективность доставки противоопухолевых препаратов в клетки опухолей головного мозга.

Научная новизна и практическая ценность работы.

Одним из самых ранних событий запрограммированной клеточной гибели является диссоциация белка AIF от наружной митохондриальной мембраны (НММ). Исследовав этот процесс, мы впервые показали, что AIF локализуется на НММ благодаря взаимодействию с белком теплового шока Морталином. При индукции апоптоза происходит изменение конформации AIF, потеря его взаимодействия с Морталином и транслокация в ядро клетки.

Следующим этапом апоптоза является выход проапоптотических факторов из межмембранного пространства митохондрий. Чтобы защитить себя от этого процесса опухолевые клетки экспрессируют избыточные количества белка Сурвивин. Исследовав функции Сурвивина, мы впервые показали, что именно мономер Сурвивина обладает проонкогенной активностью, ингибируя апоптоз и способствуя прогрессии митоза. С другой стороны, димер Сурвивина, по-видимому, выполняет функции более свойственные для нормальных клеток, такие как стабилизация микротрубочек и ингибирования STAT3 сигнального пути.

Изменение локализации перечисленных выше белков приводит к нарушению функций митохондрий, продукции свободных радикалов и перекисному окислению липидов. В данной работе мы впервые показали, что клетки большинства солидных опухолей имеют амплификацию гена Параоксоназы 2 (PON2), и, как следствие, экспрессируют повышенное количество соответствующего белка. PON2 обладает выраженной антиоксидантной активностью и позволяет раковым клеткам защитить себя от гибели, вызванной нарушением функций митохондрий. В соответствии с этими данными мы продемонстрировали, что высокий уровень экспрессии PON2 является плохим прогностическим фактором для пациентов с разнообразными типами злокачественных опухолей.

Наконец, если ни одни из описанных выше защитных механизмов не помог опухолевой клетке предотвратить запуск программы апоптоза, то последняя возможность избежать гибели — это ингибирование уже активированных каспаз (главных эффекторов апоптоза). Ключевую роль в этом процессе играет белок Трансглутаминаза 2 (TGM2). В нашем исследовании мы впервые создали систему, позволяющую следить за изменением конформации TGM2 в живых клетках в режиме реального времени. С помощью этой системы мы показали, что при индукции апоптоза происходит смена конформации TGM2 и активация её кросс-сшивающей функции, которая важна для ингибирования каспаз.

Получив данные о внутриклеточных механизмах апоптоза, мы задались вопросом о том, как погибающие раковые клетки действуют на окружающую опухоль. Исследовав влияние химио- и радиотерапии на различные типы рака, мы впервые показали, что апоптотические опухолевые клетки секретируют во внеклеточную среду сплайсосомные белки, заключённые внутри мембранных пузырьков (везикул). Эти везикулы захватываются соседними выжившими опухолевыми клетками, а сплайсосомные белки, находящиеся в них, перемещаются в ядро реципиентных клеток и переключают тип сплайсинга пре-мРНК многих важнейших онкогенов. Такие изменения в сплайсинге способствуют приобретению опухолевыми клетками более агрессивного и устойчивого к терапии мезенхимального фенотипа и, как следствие, вторичному росту опухоли после терапии.

Чтобы снизить негативный эффект от пропролиферативных сигналов, продуцируемых клетками, массово гибнущими в ходе классических методов терапии рака, и уменьшить вероятность возникновения вторичных более резистентных опухолей мы решили создать препараты, направленно действующие на небольшую популяцию стволовых клеток глиобластомы. В ходе этой работы нами были разработаны новые низкомолекулярные ингибиторы трёх белков, обладающие противоопухолевой активностью *in vitro* и *in vivo*:

(1) LLP3: ингибитор регулятора апоптоза - белка Сурвивин, связывающийся с Сурвивином с $K_d = 0.2 \mu\text{M}$ и убивающий стволовые клетки глиобластомы с $IC_{50} = 30 \mu\text{M}$.

(2) CMP3a: ингибитор регулятора сплайсинга - киназы NEK2, ингибирующий активность NEK2 с $IC_{50} = 0,015 \mu\text{M}$ и убивающий стволовые клетки глиобластомы с $IC_{50} = 0,01-0,05 \mu\text{M}$.

(3) GA11: ингибитор маркера стволовых опухолевых клеток - альдегид дегидрогеназы ALDH1A3, убивающий стволовые клетки глиобластомы с $IC_{50} = 0,2-0,5 \mu\text{M}$.

Большой проблемой в разработке новых препаратов для лечения глиобластомы является наличие гематоэнцефалического барьера, плохо проницаемого для большинства лекарств. Кроме того, даже если препарат оказался внутри клетки ему необходимо попасть в тот компартмент, в котором находится его мишень. Чтобы исследовать распределение низкомолекулярных соединений различной природы внутри клеток глиобластомы мы разработали новый метод на основе TOF-SIMS масс спектрометрии. Эта технология позволила получить ряд новых данных о распределении липидов, аминокислот и противоопухолевых препаратов *in vitro* и *in vivo*.

Таким образом, в данной работе были получены важные фундаментально-научные данные о молекулярных механизмах апоптоза и его роли в эволюции и прогрессии опухолей. Также были созданы низкомолекулярные ингибиторы, которые могут обладать прикладной ценностью, как основа для разработки новых противоопухолевых препаратов. Наконец, модифицированный нами метод TOF-SIMS масс-спектрометрии может найти своё место в клинической практике для быстрого определения концентраций липидов и лекарственных препаратов в образцах клеток и тканей пациентов.

Публикация и апробация результатов работы.

По теме диссертации опубликовано 20 статей в рецензируемых отечественных и зарубежных научных журналах. Результаты диссертационной работы были представлены на российских и международных конференциях, в том числе на FEBS Congress (Прага, 2018); Proteomic Forum (Потсдам, 2017); Experimental Biology meeting (Сан Диего, 2016 и 2012); 14th Human Proteome Organization World Congress (Ванкувер, 2015); на VII съезде по радиационным исследованиям (Москва, 2014); школе конференции Биология - Наука XXI века (Пушино, 2010); на международной конференции, посвящённой 75-летию со дня рождения академика Ю.А. Овчинникова (Москва, 2009), а также на других конференциях.

Личный вклад автора.

Все результаты за исключением химического синтеза низкомолекулярных ингибиторов были получены лично автором, либо под его непосредственным руководством. Химический синтез был осуществлён зарубежными коллабораторами на основе данных автора по исследованию молекулярного механизма действия соответствующих белков. Автор осуществлял планирование и проведение экспериментов, выбор методов, анализ и подготовку результатов к публикации.

Структура и объем диссертации.

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, изложения результатов работы и их обсуждения, экспериментальной части, выводов и списка литературы. Работа изложена на 219 страницах, содержит 110 рисунков и 3 таблицы. Список литературы включает 216 источников.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Исследование молекулярного механизма действия белков-ингибиторов апоптоза в опухолевых клетках.

Действие противоопухолевых препаратов может привести к двум противоположным итогам: к запуску программы клеточной гибели или к активации путей, позволяющих тем или иным образом восстановить клетку после повреждения. То какое из этих событий всё-таки произойдёт зависит от сложного баланса белков ингибиторов и активаторов апоптоза. Ситуация дополнительно усложняется тем, что существует множество различных путей запрограммированной клеточной гибели, причудливым образом разветвляющихся и пересекающихся друг с другом. Хотя исследованию апоптоза посвящены сотни тысяч статей, до сих пор роль многих белков, участвующих в данном процессе, остаётся загадкой. Чтобы улучшить понимание механизмов клеточной гибели, без которого невозможно создание эффективных противоопухолевых препаратов, на первом этапе нашей работы мы исследовали роль нескольких ключевых, однако, мало изученных белков ингибиторов апоптоза и показали, как эти белки помогают раковым клеткам выживать под действием терапии.

1.1. Механизм ингибирования каспазезависимого пути апоптоза белком Морталин.

Среди всех путей апоптоза наиболее быстро происходит активация каспазезависимого механизма клеточной гибели, который индуцируется уже через 15-30 минут после некоторых типов повреждения ДНК. Первым этапом этого процесса является диссоциация белка АIF от наружной митохондриальной мембраны (НММ). Такую диссоциацию вызывает поли-АДФ рибоза, взаимодействующая с АIF и изменяющая его конформацию. Однако, как именно АIF связывается с НММ и почему изменение конформации этого белка приводит к потере его взаимодействия с НММ до сих пор не было понятно.

Мы предположили, что АIF локализуется на поверхности НММ благодаря связыванию с неким белком-адаптером, заякоренным на НММ. Чтобы определить этот белок мы изучили взаимодействия рекомбинантного АIF с белками, выделенными из НММ. Белки, связавшиеся с иммобилизованным АIF, были идентифицированы с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии. Один из белков, способных взаимодействовать с АIF, но не с контрольным рекомбинантным белком, был определён как Морталин (**Рис. 1**) - представитель семейства белков теплового шока, ассоциированный с внешней поверхностью НММ.

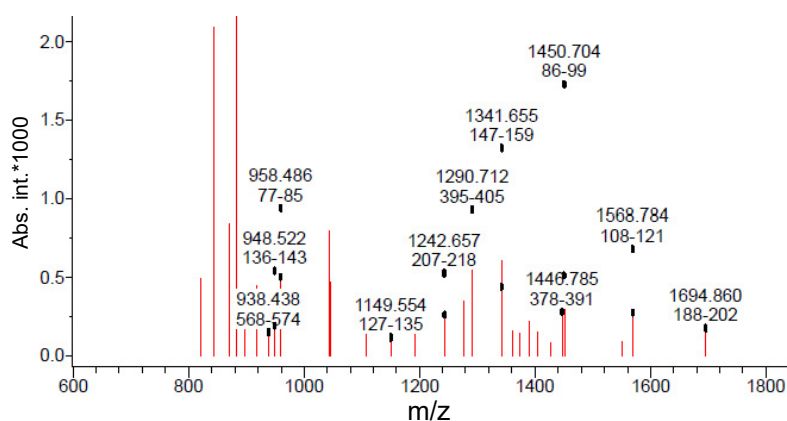


Рис. 1. Масс спектр белков НММ, взаимодействующих с АIF. Указаны пептиды, относящиеся к белку Морталин.

Белок Морталин содержит два функциональных фрагмента. С N-конца располагается АТР связывающий домен (1-443 а.о.), а с С-конца пептид связывающий домен (444-581 а.о.). Чтобы определить какой из этих доменов важен для взаимодействия с АIF мы проверили связывание полноразмерного АIF с N- и С- концевыми фрагментами Морталина (1-433 а.о. и 433-666 а.о. **Рис. 2А**). Соответствующие рекомбинантные белки были выделены из бактерий *E. Coli* (**Рис. 2Б**) и добавлены к магнитным частицам с иммобилизованным на них АIF. Связавшиеся с сорбентом белки были элюированы и разделены в полиакриламидном геле (**Рис. 2В**). По результатам электрофореза видно, что фрагмент Mort II (433-666 а.о.) взаимодействует с АIF *in vitro*, а фрагмент Mort I к такому взаимодействию не способен.

После идентификации фрагмента Морталина, способного связываться с АIF, мы решили определить участок АIF необходимый для данного взаимодействия. С этой целью мы выделили из бактерий полноразмерный АIF (fAIF), а также процессированный АIF (apoAIF; 103-613 а.о., **Рис. 2А**), возникающий при индукции апоптоза. Рекомбинантные фрагменты АIF были иммобилизованы на магнитных частицах, после чего к частицам добавляли фракцию солюбилизированных белков НММ (содержащую Морталин). Связавшиеся с сорбентом белки

были элюированы и разделены в полиакриламидном геле. Наличие Морталина определялось с помощью иммуноблотинга. Из результатов иммунодетекции (**Рис. 2Г**) видно, что эндогенный Морталин взаимодействует с полноразмерным рекомбинантным fAIF *in vitro* и не взаимодействует с apoAIF. Такой результат хорошо согласуется с ранее опубликованными данными о том, что apoAIF не способен локализоваться на НММ.

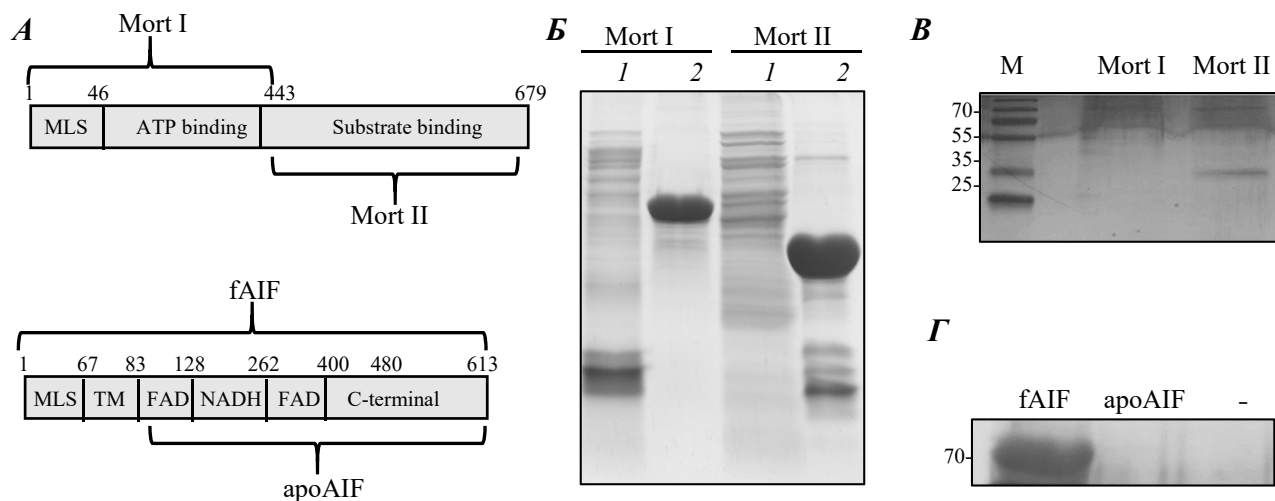


Рис. 2. Взаимодействие AIF и Морталина *in vitro*. **А** – Схема белков Морталин и AIF. **Б** – Электрофореграмма, демонстрирующая чистоту выделения рекомбинантных фрагментов Морталина из бактерий *E. Coli* (1- до оптимизации условий; 2- после оптимизации условий). **В** – Электрофореграмма, демонстрирующая взаимодействие рекомбинантных фрагментов Морталина с полноразмерным AIF, иммобилизованным на магнитных частицах. **Г** – Иммунодетекция эндогенного Морталина, элюированного с магнитных частиц, на которых были иммобилизованы рекомбинантные фрагменты AIF.

Чтобы подтвердить, что AIF может взаимодействовать с Морталином не только *in vitro*, но и внутри живой клетки *in vivo*, мы использовали метод бимолекулярной комплементации флуоресценции (BiFC). Этот метод основан на том, что жёлтый флуоресцентный белок (YFP) способен флуоресцировать, даже будучи разделённым на две отдельные части, в случае если обе половины YFP окажутся на достаточно близком расстоянии друг от друга. По этой причине мы создали плазмиды, кодирующие Морталин, соединённый с N-концевой частью YFP (Mort-YN), и fAIF, несущий C-концевой фрагмент YFP (YC-AIF) (**Рис. 3А**). Этими плазмидами были котрансфецированы клетки глиобластомы человека. Кроме того, в качестве положительного контроля клетки котрансфецировались плазмидами, кодирующими YC-AIF и белок XIAP с N-концевой частью YFP (YN-XIAP), взаимодействие этих белков было продемонстрировано ранее. В качестве отрицательного контроля клетки котрансфецировали плазмидами, кодирующими YC-AIF и свободную N-концевую часть YFP (YN). Как видно из рисунка 3А, в клетках, коэкспрессирующих YC-AIF и Mort-YN, а также в клетках, коэкспрессирующих YC-AIF и YN-XIAP, наблюдается яркая флуоресценция YFP. Такой результат подтверждает, что AIF и Морталин взаимодействуют друг с другом *in vivo*.

Следующим шагом мы исследовали, как меняется интенсивность взаимодействия AIF-Морталин на ранних стадиях апоптоза. Для этого клетки глиобластомы обрабатывались цисплатином $[Pt(NH_3)_2Cl_2]$ - широко используемым препаратом для химиотерапии многих типов опухолей. Далее клетки лизировали и лизат смешивали с магнитными частицами с иммобилизованным на них рекомбинантным Морталином. В качестве контроля использовался лизат не обработанных цисплатином клеток. Связавшиеся белки были элюированы и разделены в полиакриламидном геле. Наличие AIF определялось с помощью иммуноблотинга. Из **рисунка 3Б** видно, что рекомбинантный Морталин взаимодействует с эндогенным полноразмерным AIF в нормальных клетках, но при индукции апоптоза интенсивность этого взаимодействия заметно снижается.

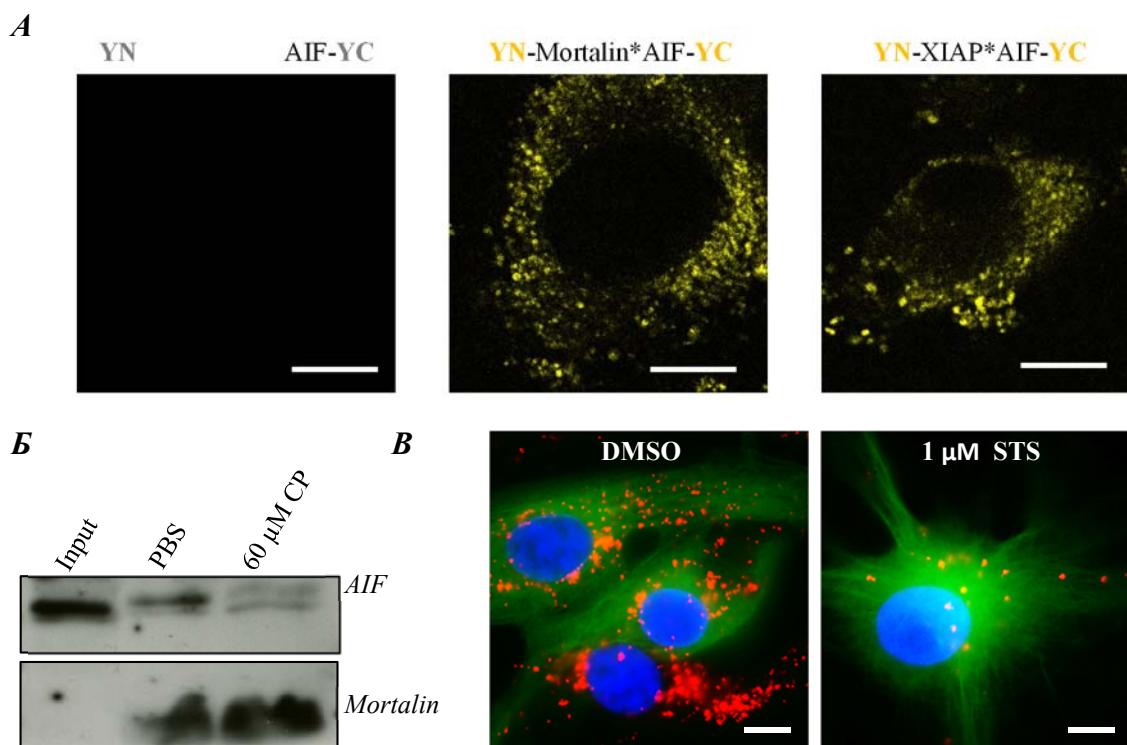


Рис. 3. Взаимодействие Морталина и AIF в живой клетке. **А** - Флуоресценция YFP в клетках U87-MG, коэкспрессирующих YC-AIF и YN (слева), YN-Mort (в центре) или YN-XIAP (справа). **Б** - Иммунодетекция эндогенного AIF из лизатов клеток U87MG, обработанных цисплатином (CP) или PBS. Лизат пропускали через магнитные частицы с иммобилизованным полноразмерным Морталином, после чего связавшиеся белки элюировали и разделяли в полиакриламидном геле. **В** - Визуализация взаимодействия белков Морталина и AIF методом PLA после обработки стауроспорином (STS) или DMSO.

Для того чтобы подтвердить такой результат, мы использовали метод “in situ proximity ligation assay” (PLA), а также другой широко используемый индуктор апоптоза - стауроспорин. Принцип PLA анализа заключается в том, что фиксированные и пермеабелизованные клетки инкубируются с антителами к исследуемым белкам. Эти антитела ковалентно связаны с олигонуклеотидами особой последовательности и длины. Если олигонуклеотиды, соединённые с разными антителами, оказались достаточно близко друг от друга (такое происходит в случае взаимодействия исследуемых белков), то при добавлении ДНК-

полимеразы на этих нуклеотидах начинается амплификация ДНК, которая затем детектируется с помощью флуоресцентно-меченных зондов. Результаты этого эксперимента (**Рис. 3В**) показывают, что после индукции апоптоза, интенсивность взаимодействий Морталин-AIF значительно снижается, что согласуется с данными полученными ранее.

Исходя из всех результатов, описанных выше, можно предположить, что повышенное количество Морталина в раковых клетках может способствовать усилению связывания AIF с НММ, ведущему к более высокой устойчивости клеток к апоптозу и, как следствие, к более агрессивному фенотипу опухоли. Чтобы проверить связь экспрессии Морталина с выживаемостью пациентов, мы использовали публично доступную базу данных Rembrandt, содержащую информацию об экспрессии генов и времени жизни пациентов с опухолями головного мозга. Анализ этой базы данных показал, что более высокая экспрессия Морталина статистически значимо коррелирует с плохой выживаемостью пациентов с глиобластомой.

1.2. Механизм ингибирования каспаззависимого пути апоптоза белком Сурвивин.

Активация AIF индуцируемого апоптоза наблюдается лишь в некоторых весьма специфических условиях. Более распространённым вариантом клеточной гибели, по-видимому, является классический каспаззависимый путь апоптоза. На первом этапе данного процесса происходит выход проапоптотических факторов (Цитохром С и Smac/DIABLO) из межмембранного пространства митохондрий. Чтобы защитить себя от этих белков, опухолевые клетки экспрессируют избыточные количества белка Сурвивин. Многими авторами было показано, что Сурвивин склонен к образованию димеров, и поэтому считалось, что мономер Сурвивина не имеет значимых функций. Такая ситуация показалась нам биологически не целесообразной, и поэтому мы решили впервые изучить функции мономера этого белка.

В первую очередь мы исследовали способность мономера Сурвивина ингибировать проапоптотический белок Smac/DIABLO с помощью анализа взаимодействия соответствующих рекомбинантных белков (**Рис. 4А**), а также используя метод регистрации FRET с техникой фотообесцвечивания акцептора (**Рис. 4Б**). Полученные результаты свидетельствуют о том, что *in vitro* и *in vivo* мутант Сурвивина, не способный к димеризации (Сурвивин^{F101A/L102A}), может взаимодействовать с белком Smac/DIABLO. Также нами было показано, что для взаимодействия этих белков необходим участок димеризации Сурвивина. Далее, используя метод РНК интерференции и клеточные линии, стабильно экспрессирующие различные мутанты Сурвивина, мы получили данные, говорящие в пользу того, что мутант Сурвивина, не способный к димеризации, более эффективно ингибирует Smac/DIABLO, чем Сурвивин дикого типа (WT) (**Рис. 4В и 4Г**).

Исследуя участие мономера Сурвивина в защите клетки от апоптоза через увеличение стабильности антиапоптотического белка XIAP, нам удалось показать, что XIAP способен взаимодействовать не только с Сурвивином дикого типа, но и с его мутантом, не образующим димеров, причём по данным регистрации FRET взаимодействие XIAP с мономерной формой Сурвивина было значительно сильнее (**Рис. 5А и 5Б**). Следующим шагом мы изучили влияние Сурвивина на каспаззависимый апоптоз и показали, что Сурвивин^{F101A/L102A} лучше, чем Сурвивин дикого типа ингибирует AIF-индуцированный путь апоптоза (**Рис. 5В**).

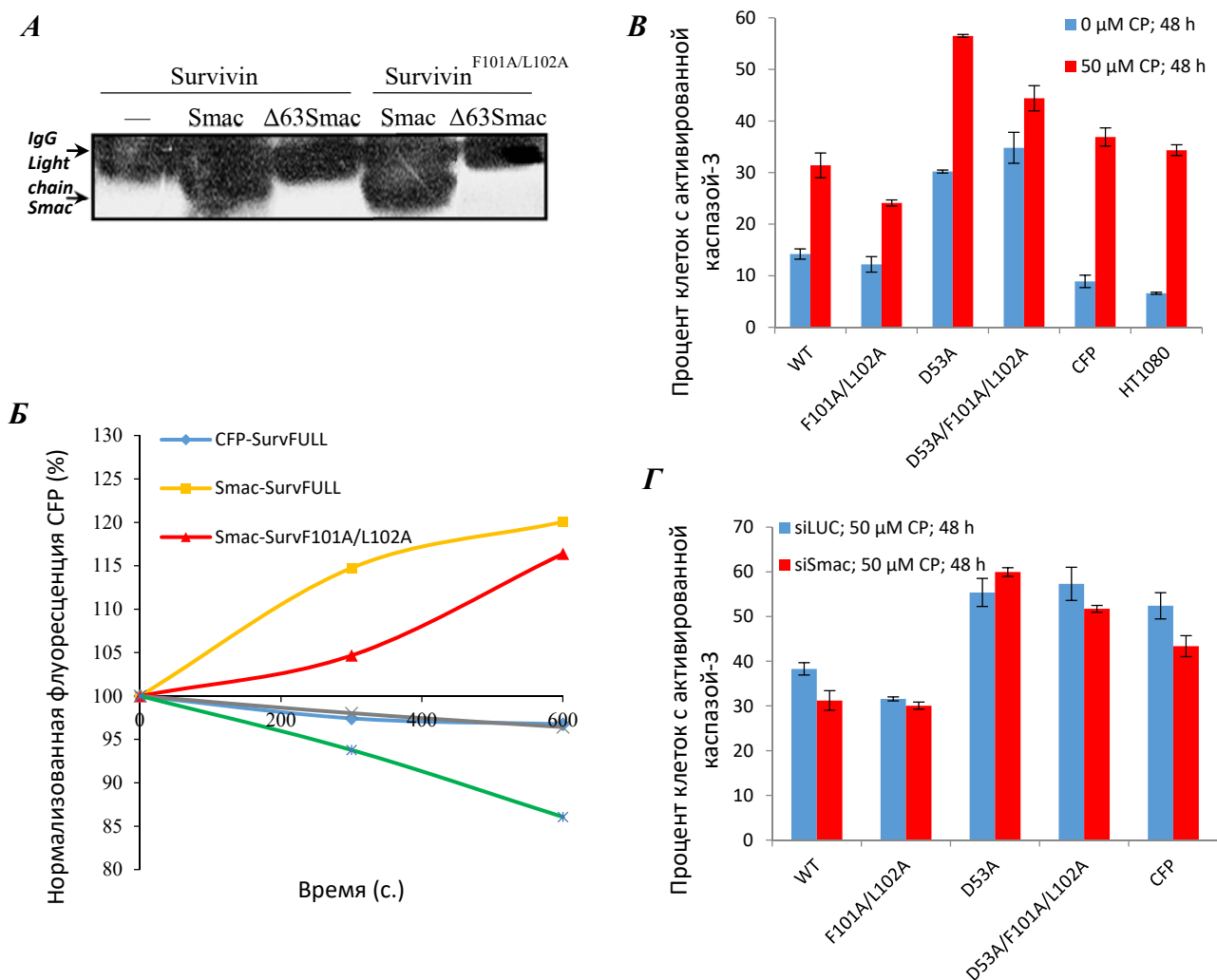


Рис 4. *А* - Иммунодетекция Сурвивина дикого типа и Сурвивина^{F101A/L102A}, в образцах, полученных при элюции белков, связавшихся с иммобилизованным Smac/DIABLO и его делеционным мутантом. *Б* - Графики зависимости интенсивности флуоресценции CFP от времени фотообесцвечивания YFP в клетках, коэкспрессирующих YFP-Сурвивин или YFP-Сурвивин^{F101A/L102A} и CFP, Smac/DIABLO-CFP или Δ63 Smac/DIABLO-CFP. *В* - Активация каспазы-3 до и после обработки цисплатином клеток, экспрессирующих различные мутанты Сурвивина. *Г* - Влияние миРНК против Smac/DIABLO на активацию каспазы-3, вызванную цисплатином, в клетках, экспрессирующих различные мутанты Сурвивина.

Таким образом, из наших результатов следует, что неспособный к димеризации Сурвивин обладает более высокой антиапоптозной активностью, чем Сурвивин дикого типа, который существует как в виде димера, так и в виде мономера.

В заключении, мы исследовали функции Сурвивина, не связанные с регуляцией апоптоза, и впервые показали, что только димер Сурвивина увеличивает стабильность микротрубочек в интерфазе (**Рис. 5Г**). Таким образом, если предположить, что часть своих функций Сурвивин выполняет в виде димера, а часть в виде мономера, то регуляция

равновесия димер - мономер может служить для «переключения» между различными функциями этого белка (Рис. 6).

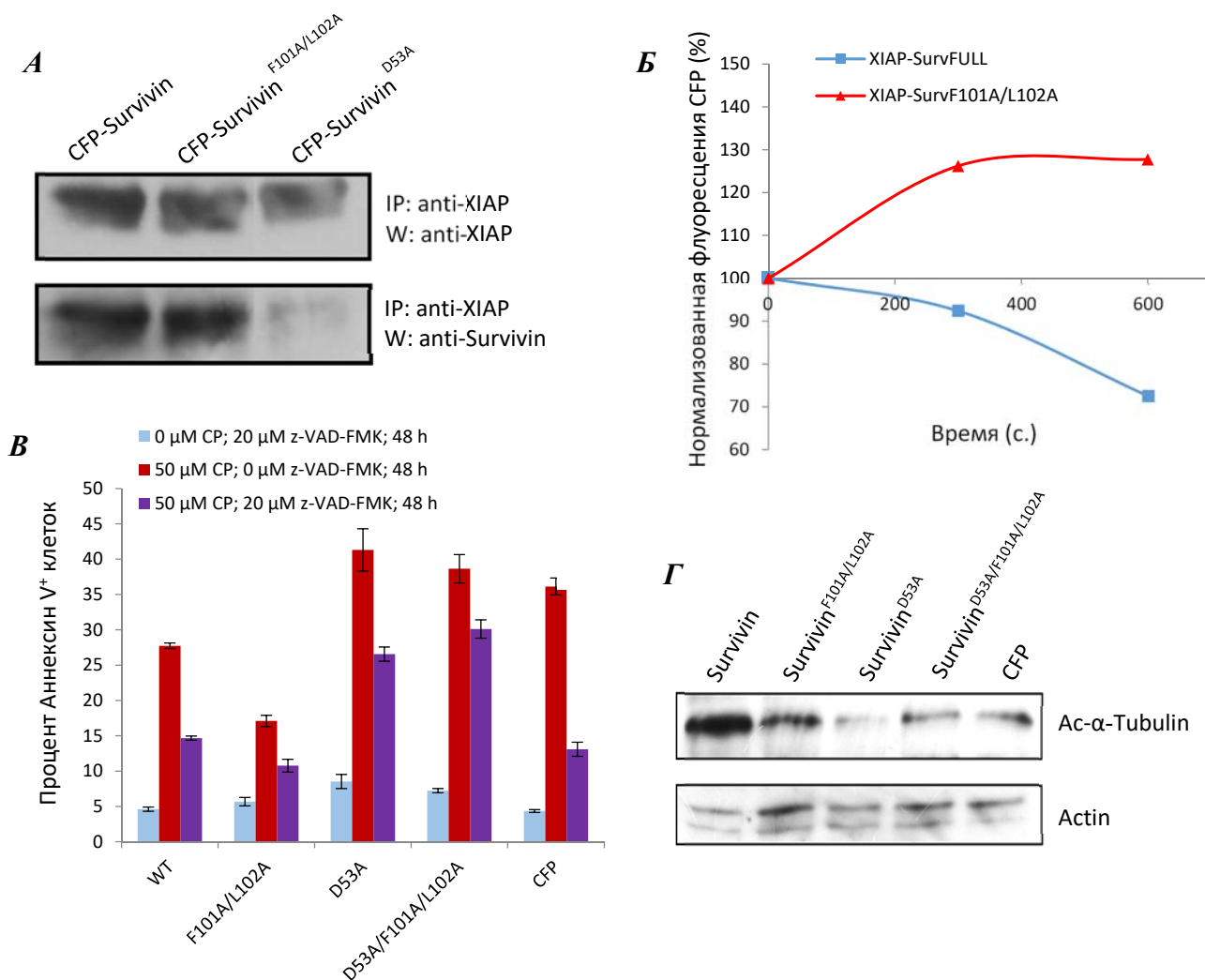


Рис. 5. *А* - Иммунодетекция различных мутантов Сурвивина, коиммунопреципитирующих с белком XIAP. *Б* - Графики зависимости интенсивности флуоресценции CFP от времени фотообесцвечивания YFP в клетках, коэкспрессирующих YFP-Сурвивин или YFP-Сурвивин^{F101A/L102A} и CFP-XIAP. *В* - Экспонирование фосфатидилсерина на наружную поверхность мембраны в клетках, экспрессирующих различные мутанты Сурвивина после обработки этих клеток цисплатином в отсутствие или в присутствии ингибитора каспаз. *Г* - Иммунодетекция ацетилированного α-тубулина, маркера стабилизированных микротрубочек, в клетках, экспрессирующих различные мутанты Сурвивина.

Всё вышеперечисленное свидетельствует о том, что, во-первых, участок димеризации играет ключевую роль в регуляции активности Сурвивина в клетках и, во-вторых, что именно мономер Сурвивина (т.е. Сурвивин с открытым участком димеризации) выполняет наиболее важные для раковых клеток функции - защищает их от запрограммированной клеточной

гибели. Такие результаты позволили нам предположить новую модель функционирования Сурвивина в опухолевых клетках (**Рис. 6**).

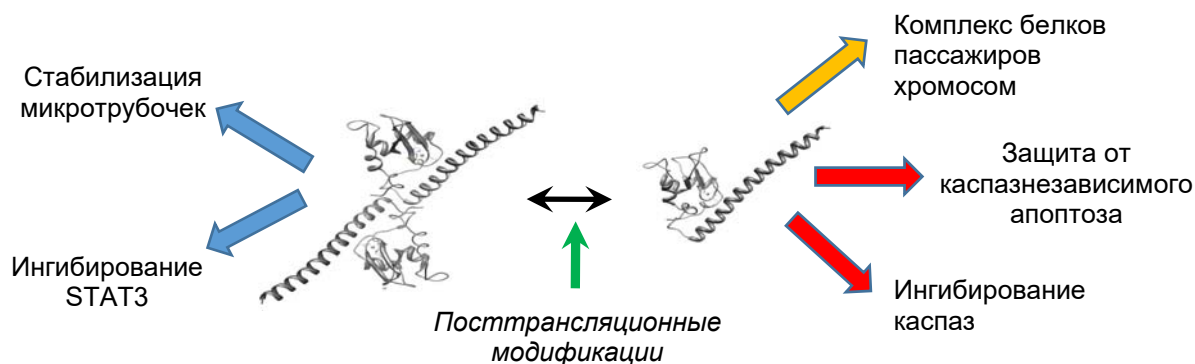


Рис. 6. Предполагаемая модель функционирования Сурвивина. В клетке димерная и мономерная формы Сурвивина находятся в состоянии динамического равновесия, которое может сдвигаться в ту или иную сторону с помощью различных посттрансляционных модификаций этого белка. Данная модель была впервые описана в кандидатской диссертации Павлюкова М.С.

1.3. Роль белка Параоксоназа 2 в защите клетки от активных форм кислорода.

Происходящее на ранних этапах апоптоза изменение локализации AIF, Цитохрома С и Smac/DIABLO приводит к нарушению функций митохондрий, продукции активных форм кислорода и перекисному окислению мембран. Параоксоназа 2 (PON2) является одним из белков, защищающих клетки от этих процессов, однако её участие в развитии и прогрессии онкологических заболеваний до сих пор вызывает много вопросов.

Для того чтобы определить в каких видах злокачественных опухолей PON2 может играть потенциально важную онкогенную роль, мы изучили экспрессию этого гена используя результаты РНК секвенирования из базы данных TCGA (The Cancer Genome Atlas). Проанализировав данные, полученные от более чем 10 000 пациентов с 31 видом раковых опухолей мы обнаружили, что наибольший уровень экспрессии PON2 наблюдается при раке печени и раке головного мозга (1-3 стадии глиомы и 4 стадия глиобластома), а самый низкий уровень этого белка характерен для рака крови (миелоидной лейкемии и В-клеточной лимфомы) (**Рис.7А**). Интересно, что аналогичные результаты были получены при анализе данных секвенирования геномной ДНК. Мы показали, что для глиобластомы характерна амплификация гена PON2, а для лейкемии, напротив, делеция этого гена.

Чтобы оценить влияние PON2 на пролиферацию и устойчивость к терапии опухолевых клеток, мы проверили, как уровень экспрессии этого белка связан с выживаемостью пациентов с различными видами рака. Данные на **рисунке 7Б** убедительно показывают, что для глиобластомы (аналогичные результаты были получены для рака печени и глиомы 2ой и 3ей стадии) высокий уровень PON2 коррелирует с плохим прогнозом для выживаемости пациентов, в то время как для лейкемии наблюдается противоположная картина – повышенное количество параоксоназы 2 наоборот является хорошим прогностическим фактором.

Отличительной клинической особенностью рака головного мозга является большая некротическая зона, возникающая в центре опухоли, её объём зачастую может во много раз превышать количество живой опухолевой ткани. Такой высокий уровень гибели раковых клеток связан с недостаточным кровоснабжением глиобластом и крайне ограниченным пространством для роста. По этой причине клетки глиобластомы постоянно находятся в условиях стресса, вызванного нехваткой питательных веществ и токсичными компонентами, выделяемыми соседними погибающими клетками. Аналогичная ситуация наблюдается в печени, так как именно в этот орган поступают потенциально опасные соединения из крови. Таким образом, можно предположить, что PON2 имеет важное значение для клеток рака печени и мозга, так как помогает им приспособиться к существованию в среде с высокой концентрацией токсичных продуктов метаболизма. Напротив, клетки рака крови существуют в благоприятной среде, богатой кислородом, питательными веществами и, не содержащей потенциально токсичных соединений. В следствие этого, они не нуждаются в высоком уровне экспрессии PON2.

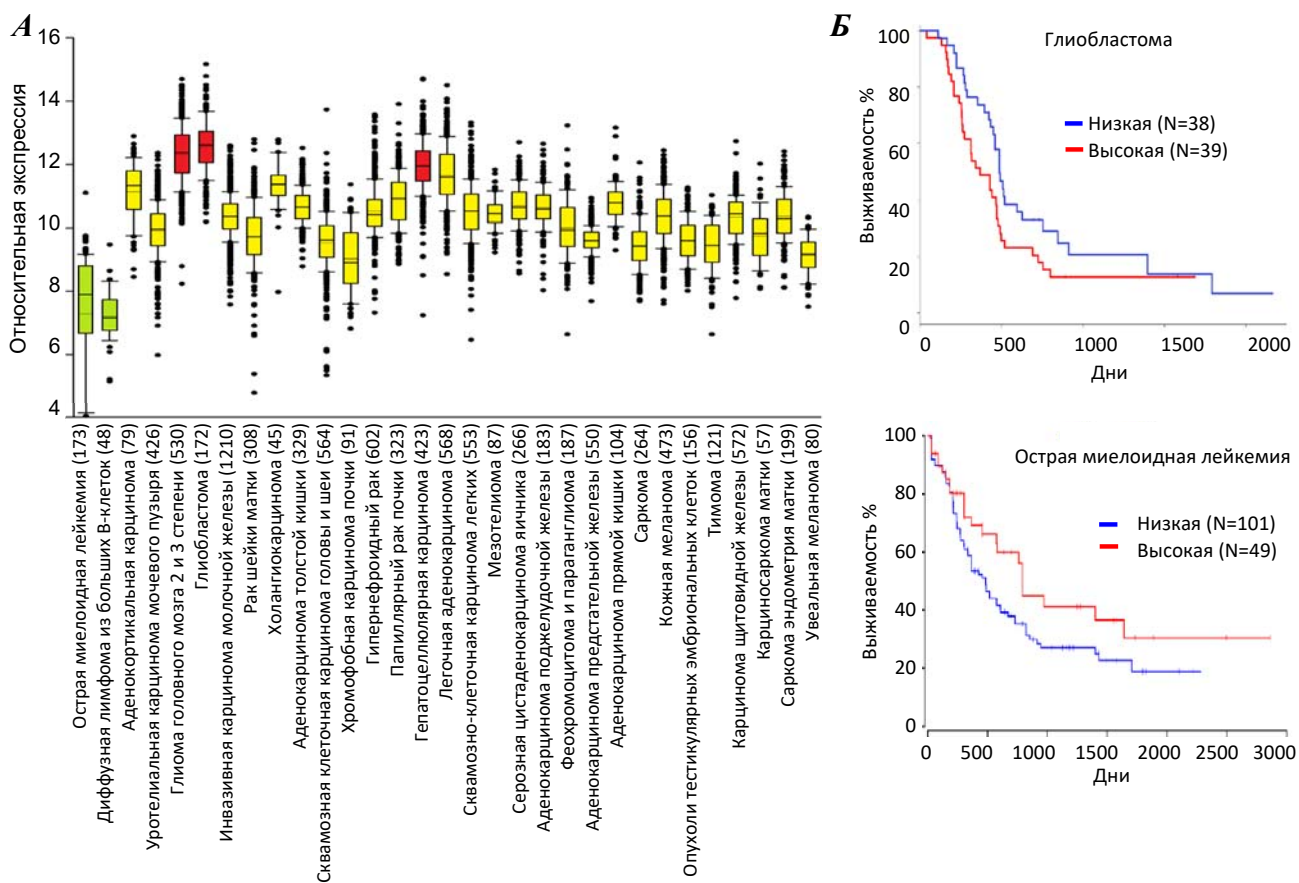


Рис. 7. А - Относительный уровень экспрессии гена PON2 в опухолях от пациентов с различными видами рака. **Б** - Кривые Каплана-Мейера, показывающая выживаемость пациентов с глиобластомой и острой миелоидной лейкозией. Пациенты были разделены на 2 группы на основании экспрессии PON2.

Чтобы получить больше информации о функциях PON2 в опухолях мы окрасили различные клеточные линии антителами на этот белок. Наши результаты показали, что во всех

исследованных типах клеток PON2 локализовалась в области вокруг ядра. Чтобы точно определить локализацию PON2 мы окрасили клетки, оверэкспрессирующие PON2 слитый с GFP, антителами на CRM1- маркер ядерной мембраны. Как видно из **рисунка 8**, PON2 вокруг ядра полностью колокализуется с CRM1, это говорит о том, что существенная фракция PON2 в клетке расположена на ядерной мембране.

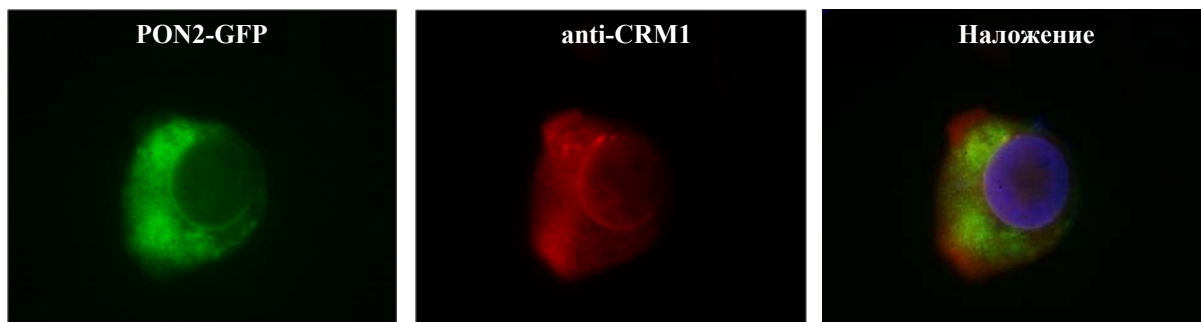


Рис. 8. Флуоресцентная микрофотография клеток, трансфицированных плазмидой *pTurboGFP-N-PON2* и затем окрашенных антителами на CRM1.

В заключение мы задались целью определить белки, взаимодействующие с PON2. Для этого мы трансфицировали клетки плазмидой, кодирующей PON2 или контрольный белок с последовательностью Halo-tag на С-конце, и, используя магнитные частицы с лигандом для Halo-tag, выделили экзогенный PON2 и связанные с ним белки. Последующий LC-MS/MS анализ позволил определить 119 белков, специфически взаимодействующих с PON2. Среди этих белков оказалось 6 белков, локализованных на ядерной мембране (CACYBP, TMPO, S100A6, RAN, UBXLN4, TOR1AIP1). Важно отметить, что для белка CACYBP было идентифицировано наибольшее (за исключением PON2) количество пептидов, такой результат может говорить о высокой интенсивности взаимодействия CACYBP и PON2.

Основываясь на полученных нами данных, можно предположить, что в опухолевых клетках PON2 защищает внутриклеточные мембраны от окисления, а также, возможно, не позволяет свободным радикалам проникнуть сквозь ядерную мембрану и повредить генетический материал клеток. Таким образом PON2 способствует выживаемости солидных опухолей, развивающихся в неблагоприятных условиях.

1.4. Динамика конформационных изменений белка Трансглутаминаза 2 - ингибитора активированной каспазы-3.

Выше было описано три белка, каждый из которых способен тем или иным образом ингибировать процесс запрограммированной клеточной гибели. Если ни один из механизмов защиты не помог клетке предотвратить начало апоптоза, то финалом этого процесса является активация эффекторных каспаз, в первую очередь каспазы-3, которые разрушают клеточные белки. Долгое время считалось, что активация каспазы-3 для клетки является точкой невозврата, после прохождения которой любая клетка обречена на смерть. На этом фоне удивительно выглядела работа Ямагучи и Ванга, в которой авторы утверждали, что опухолевые клетки способны эффективно ингибировать активную каспазу-3, благодаря

повышенной экспрессии уникального кросс-сшивающего фермента - Трансглутаминазы 2 (TGM2). Эти данные вызвали большое количество споров, так как TGM2 работает во внеклеточной среде в присутствии ионов Ca^{2+} , однако в цитоплазме клетки даже максимально возможная концентрация Ca^{2+} на порядок ниже той, что необходима для появления кросс-сшивающей активности у этого фермента *in vitro*.

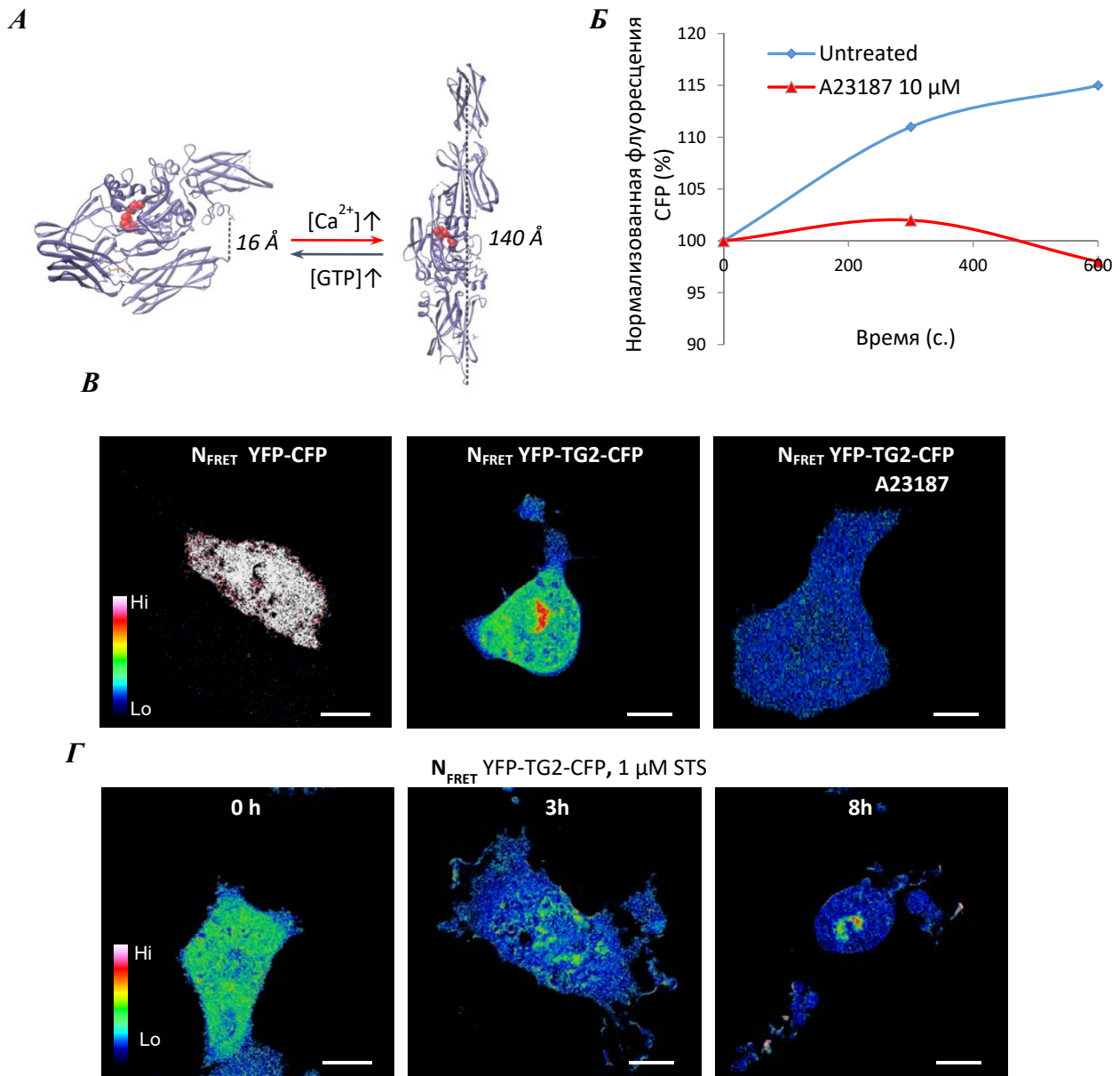


Рис. 9. *A* – Схематическое изображение конформационных изменений белка TGM2. *Б* - Графики зависимости интенсивности флуоресценции CFP от времени фотообесцвечивания YFP в клетках, экспрессирующих YFP-TGM2-CFP и обработанных Ca^{2+} ионофором A23187. *В* – Интенсивность N_{FRET} в клетках, экспрессирующих YFP-CFP (положительный контроль) или YFP-TGM2-CFP и обработанных A23187. *Г* – Интенсивность N_{FRET} в клетках, экспрессирующих YFP-TGM2-CFP и обработанных стауроспорином (STS).

Чтобы разрешить это противоречие мы впервые разработали метод, позволяющий следить за активацией TGM2 в живой клетке. Из результатов рентгеноструктурного анализа активной и неактивной форм TGM2 видно, что при активации кросс-сшивающей функции

этого фермента происходит драматическое изменение его конформации, в результате которого расстояние между N- и C- концами TGM2 увеличивается с 16Å до 140Å (**Рис. 9А**). Опираясь на эти данные, мы создали плазмиду, кодирующую TGM2 с YFP и CFP на N- и C-концах соответственно. Мы предположили, что когда TGM2 находится в неактивной «закрытой» конформации, CFP и YFP будут достаточно сближены для безизлучательного переноса энергии с CFP на YFP (FRET). После перехода TGM2 в активную «открытую» конформацию дистанция между флуоресцентными белками окажется более 100Å, и на таком расстоянии FRET станет невозможен. Для того чтобы проверить это предположение, мы трансфецировали клетки плазмидой, кодирующей YFP-TMG2-CFP, после чего добавили в культуральную среду Ca^{2+} ионофор A23187, который повышает концентрация Ca^{2+} в цитоплазме и вызывает активацию TGM2. С помощью метода фотообесцвечивания акцептора мы показали, что при обработке клеток A23187 происходит резкое уменьшение эффективности FRET (**Рис. 9Б**). Более точный количественный расчёт нормализованного сигнала FRET (N_{FRET}) подтвердил эти данные (**Рис. 9В**). Таким образом, можно утверждать, что созданная нами система действительно способна детектировать изменения конформации белка TGM2 в единичных живых клетках в режиме реального времени.

Получив подтверждения того, что наш метод позволяет правильно следить за активацией TGM2, мы исследовали изменение конформации этого фермента при индукции апоптоза. Как видно из **рисунка 9Г**, вскоре после добавления стауроспорина в трансфецированных клетках происходит уменьшение N_{FRET} до той же величины, что и в клетках, обработанных A23187. Такой результат свидетельствует о том, что уже на ранних стадиях апоптоза происходит изменение конформации и активация TGM2, что, в свою очередь, может являться дополнительным механизмом защиты опухолевых клеток от запрограммированной клеточной гибели.

2. Исследование роли апоптоза в эволюции злокачественных опухолей.

В предыдущей главе мы изучили функции нескольких белков регуляторов апоптоза внутри опухолевых клеток, однако, очень важно понимать, что сам процесс запрограммированной клеточной гибели не имеет смысла если говорить о нём в контексте единичных клеток. Биологическая функция апоптоза заключается не в уничтожении клеток, а в обеспечении выживаемости и правильного развития многоклеточного организма в целом. Поэтому, на наш взгляд, наиболее интересным и важным является вопрос о том, какое влияние погибающие клетки оказывают на многоклеточный организм или, по крайней мере, на окружающую их ткань. Из-за высокой сложности экспериментального моделирования гетерогенных совокупностей клеток и изучения межклеточных сигналов между ними в настоящее время крайне мало работ посвящено данной проблеме. Для того чтобы преодолеть эти трудности и обеспечить высокую достоверность и клиническую значимость наших результатов во всех экспериментах, описанных ниже, мы старались максимально использовать клинические образцы, полученные непосредственно от пациентов, такие как срезы опухолевой ткани, плазмы крови, асцитические жидкости и первичные культуры опухолевых клеток низкого пассажа.

2.1. Клетки аденокарциномы яичников секретируют белковые и РНК компоненты сплайсосом после сеансов химиотерапии.

Для того чтобы исследовать сигналы, продуцируемые апоптотическими опухолевыми клетками, мы решили начать с изучения наиболее простого и удобного объекта – асцитических жидкостей. Асцитическая жидкость (асцит) накапливается в брюшной полости пациентов с различными видами злокачественных новообразований, в первую очередь с раком яичника, а также при некоторых других не онкологических заболеваниях. Асциты представляют собой естественную среду обитания опухолевых клеток, которая частично отделена от других биологических жидкостей организма. Таким образом в асците происходит накопление и концентрирование разнообразных молекул, выделяемых раковыми клетками и их микроокружением. Всё это делает асциты замечательным объектом для изучения секретомов опухолевых клеток. Однако, проблемой при анализе асцитов является высокий разброс концентраций белков, превышающий 10 порядков. Такой широкий диапазон концентраций сильно затрудняет детекцию низко представленных белков. Чтобы решить эту проблему, нами был разработан новый метод фракционирования асцитов, который позволил детектировать более 2000 белков в образце. Этот результат в несколько превосходит любые данные, опубликованные ранее для асцитических жидкостей (229, 445 и 484 белков).

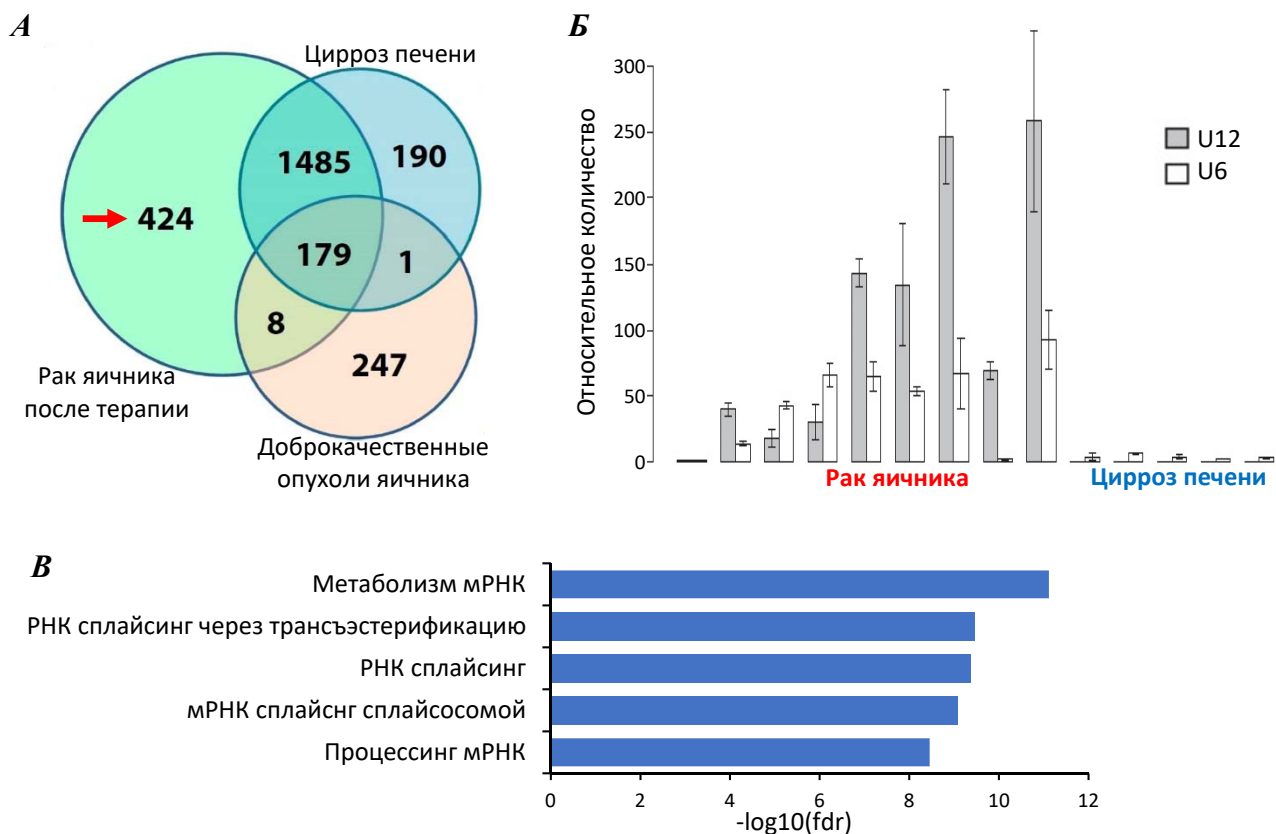


Рис. 10. **А** – Количество белков, идентифицированных в асцитах, полученных от пациентов с циррозом печени (жёлтый), доброкачественными опухолями яичников (красный) и раком яичников после терапии (синий). **Б** – Анализ обогащения белков специфичных для асцитических жидкостей пациентов с раком яичников после терапии. **В** – Относительное количество U6 и U12 РНК сплайсосомы в асцитах, полученных от пациентов с циррозом печени и раком яичников после терапии.

Мы использовали созданный нами метод фракционирования и последующую LC-MS/MS масс-спектрометрию для определения белков в образцах асцитических жидкостей, полученных от пациентов с раком яичников после сеанса химиотерапии. В качестве контроля нами были проанализированы асциты от пациентов с циррозом печени и с доброкачественными опухолями. Такие образцы позволили нам исключить из рассмотрения компоненты плазмы крови, а также белки, неспецифически секретируемые нормальными тканями в ответ на накопление жидкости в брюшной полости. Таким образом, в ходе данного эксперимента нами было определено 424 белка, появляющихся после сеанса химиотерапии в асцитических жидкостях у пациентов с раком яичников (**Рис. 10А**). Биоинформатический анализ этих белков привёл к неожиданному результату. Оказалось, что среди них наиболее сильно представлены белки, относящиеся к сплайсингу пре-мРНК (**Рис. 10Б**). Хочется особенно подчеркнуть, что асцит представляет собой внеклеточную среду, и наличие сплайсосомных белков во внеклеточной среде ни разу не было описано ранее. В норме сплайсосомные белки существуют в виде макромолекулярного комплекса (сплайсосомы) с короткими некодирующими уридин богатыми РНК (U РНК). Поэтому, чтобы подтвердить, что асциты после терапии действительно обогащены компонентами сплайсосом, мы проверили наличие U РНК в асцитических жидкостях и показали, что их уровень многократно повышен в опухолевых образцах после терапии (**Рис. 10В**).

Развивая нашу гипотезу, мы предположили, что если раковые клетки действительно способны секретировать сплайсомные белки во внеклеточную среду, то в плазме крови пациентов с опухолевыми заболеваниями должны появляться аутоантитела к этим белкам. Чтобы проверить это предположение мы выделили рекомбинантный белок сплайсосомы U2AF1 (**Рис. 11А**) и, иммобилизовав его на подложке, определили наличие антител к этому белку в плазме крови пациентов с раком яичника, остеосаркомой, раком прямой кишки, раком лёгкого и здоровых доноров в качестве контроля. Как видно из **рисунка 11Б**, для всех вышеперечисленных видов опухолей характерно повышение титра аутоантител к белку U2AF1, что подтверждает идею об экспорте сплайсосом раковыми клетками.

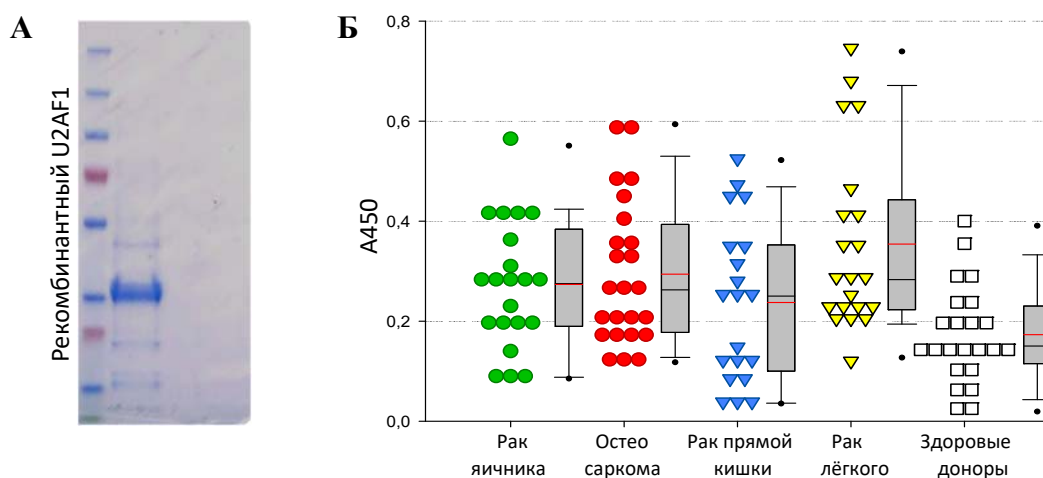


Рис. 11. А – Электрофореграмма, демонстрирующая чистоту выделения рекомбинантного U2AF1. Б – Определения титра аутоантител к белку U2AF1 в плазме крови пациентов с различными видами рака и здоровых доноров методом твёрдофазного ИФА.

Известно, что химиотерапия вызывает не только апоптотическую, но и некротическую гибель клеток, более того, даже для не обработанных препаратами опухолей характерен гораздо более высокий уровень некроза и апоптоза по сравнению с нормальными тканями. По этой причине следующая серия наших экспериментов была направлена на то, чтобы установить является ли экспорт сплайсосомных белков специфическим процессом или же сплайсосомы выходят во внеклеточную среду в следствие физического разрушения раковых клеток. Мы предположили, что если причина появления сплайсосом в асцитах это «лопанье» клеток, то вместе с U РНК из клеток должны выходить и рибосомальные рРНК. Если же экспорт сплайсосом представляет собой специфический процесс, то во внеклеточное пространство будут выходить лишь сплайсосомные РНК, в то время как рРНК останутся в клетке. Данные на **рисунке 12А** показывают, что отношение U РНК к рРНК в асцитических жидкостях более чем в 10 000 раз превышает таковое внутри клеток рака яичника. Другими словами, экспорт U РНК из клеток в 10 000 раз более эффективен, чем экспорт рРНК. Такой результат говорит в пользу гипотезы о направленном экспорте сплайсосом из опухолевых клеток, подвергшихся терапии. Следующий ключевой вопрос заключался в том, в какой форме сплайсосомы присутствуют во внеклеточной среде. Используя антитела к разнообразным сплайсосомным белкам и их комбинациям, мы попытались удалить сплайсосомы из асцитов, но все эти попытки окончились неудачно (**Рис. 12Б**). Однако, когда мы использовали антитела к белку CD63- поверхностному маркёру экзосом (мембранных везикул размером 50-200 нм), то нам удалось более чем в 3 раза понизить содержание сплайсосом в асцитических жидкостях (**Рис. 12Б**). Такой результат убедительно показывает, что сплайсосомы во внешней среде присутствуют внутри мембранных везикул и удаление этих везикул из асцитов приводит к удалению сплайсосомных U РНК.

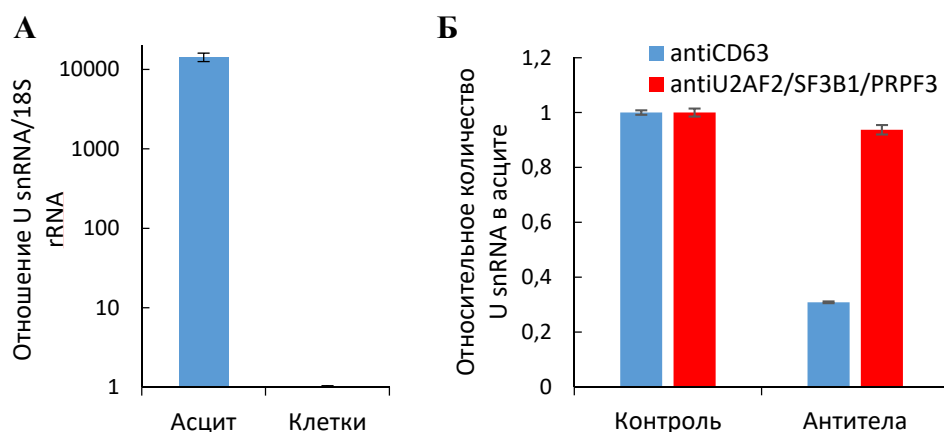


Рис. 12. А – Отношение количеств U12 РНК сплайсосомы и 18S рибосомальной РНК в асцитических жидкостях, полученных от пациентов с раком яичников после терапии, и в культуре клеток рака яичника. **Б** – Деплеция U6 сплайсосомной РНК в асцитических жидкостях с помощью различных антител, иммобилизованными на магнитных частицах.

Известно, что везикулы могут переносить огромное количество разнообразных белков от клетки к клетке, и мы посчитали необходимым определить относительную представленность сплайсосомных белков в общей совокупности белков, поступающих в реципиентные клетки с помощью везикул. Для достижения этой цели мы воспользовались методом SILAC (Stable Isotope Labeling by Amino acids in Cell culture). В ходе нашего эксперимента мы выращивали клетки рака яичника линии SKOV3 на среде, содержащей $^{13}\text{C}_6$ лизин и $^{13}\text{C}_6$, $^{15}\text{N}_4$ аргинин до тех пор, пока эффективность включения изотопной метки в клеточные белки не превысит 97% (Рис. 13А). После этого мы выделили везикулы, секретированные мечеными клетками-донорами, и добавили их к немеченым клеткам-реципиентам. Далее, используя метод LC-MS/MS масс-спектрометрии, мы определили меченые белки, которые были доставлены везикулами в немеченые клетки. Анализ перенесённых белков показал, что среди них наиболее обогащены именно белки, вовлечённые в процесс сплайсинга пре-мРНК (Рис. 13Б).

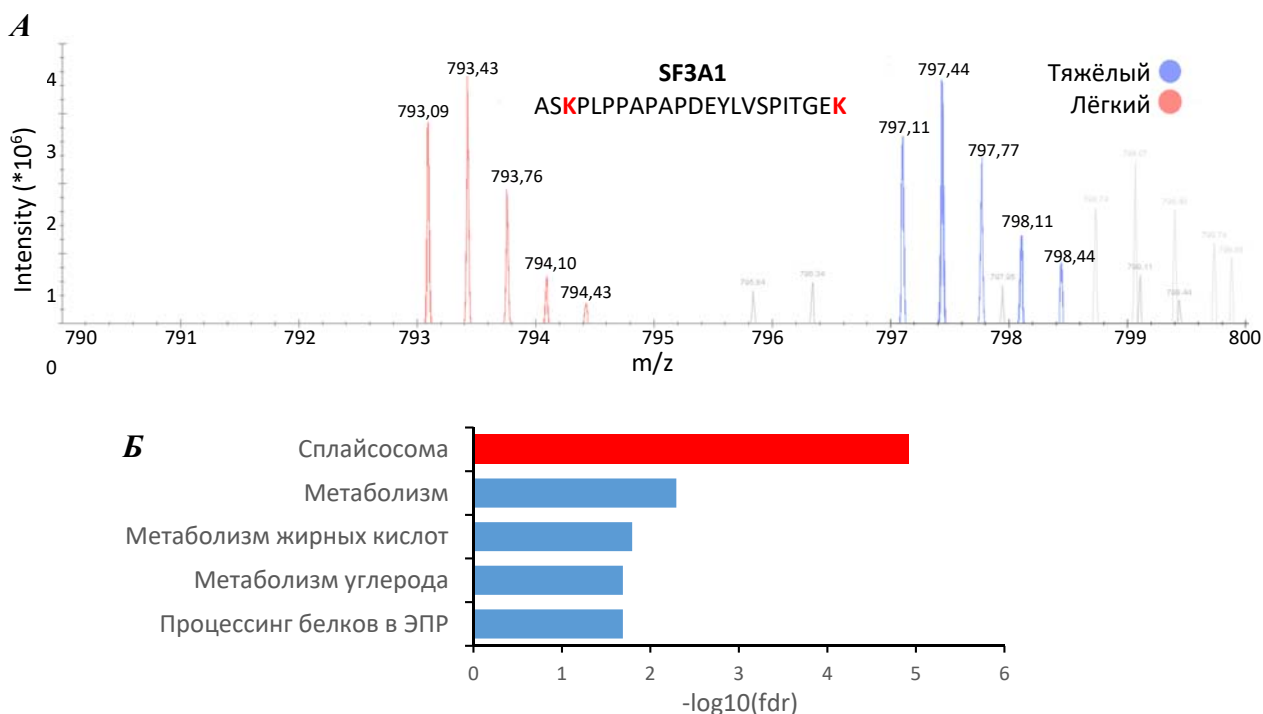


Рис. 13. *А* – Масс-спектр белков из клеток рака яичника, выращиваемых на контрольной среде (красный) или на среде, содержащей $^{13}\text{C}_6$ лизин и $^{13}\text{C}_6$, $^{15}\text{N}_4$ аргинин (синий). Указаны пики, относящиеся к фрагменту белка сплайсосомы SF3A1. *Б* – Анализ обогащения изотопно-меченных белков, идентифицированных в немеченных клетках рака яичника после их инкубации с везикулами, секретированными изотопно-мечеными клетками.

Суммируя все результаты, приведённые выше, можно сказать, что нами впервые были проанализированы асцитические жидкости, полученные пациентов до и после лечения. Эти данные впервые продемонстрировали, что под действием терапии клетки рака яичника специфически секретируют во внешнюю среду РНК и белковые компоненты сплайсосом, заключённые внутри мембранных везикул. И, наконец, мы показали, что среди всех белков, переносимых везикулами в реципиентные клетки, наиболее представлены именно белки сплайсосомы.

2.2. Клетки глиобластомы секретируют белковые и РНК компоненты сплайсосом благодаря активации каспаз, индуцируемой при действии химио- и радиотерапии.

Хотя асциты и представляют собой крайне удобную модель для исследования, они имеют не слишком высокое значение для клинической практики, так как в большинстве случаев формируются лишь на последней стадии рака яичников, когда опухолевые клетки уже образовали многочисленные метастазы. Поэтому следующие этапы нашей данной работы были выполнены на более клинически значимой, хотя и довольно сложной модели - раке головного мозга, глиобластоме. Одной из причин выбора именно этого заболевания стало то, что из-за недостатка питательных веществ, крайне ограниченного пространства для роста и очень быстро увеличивающейся клеточной массы, существенную часть опухоли занимает некротическая зона с большим количеством апоптотических клеток (**Рис. 14А**). Из-за этого мы резонно предположили, что роль апоптотических клеток в развитии данного типа новообразований может быть очень велика.

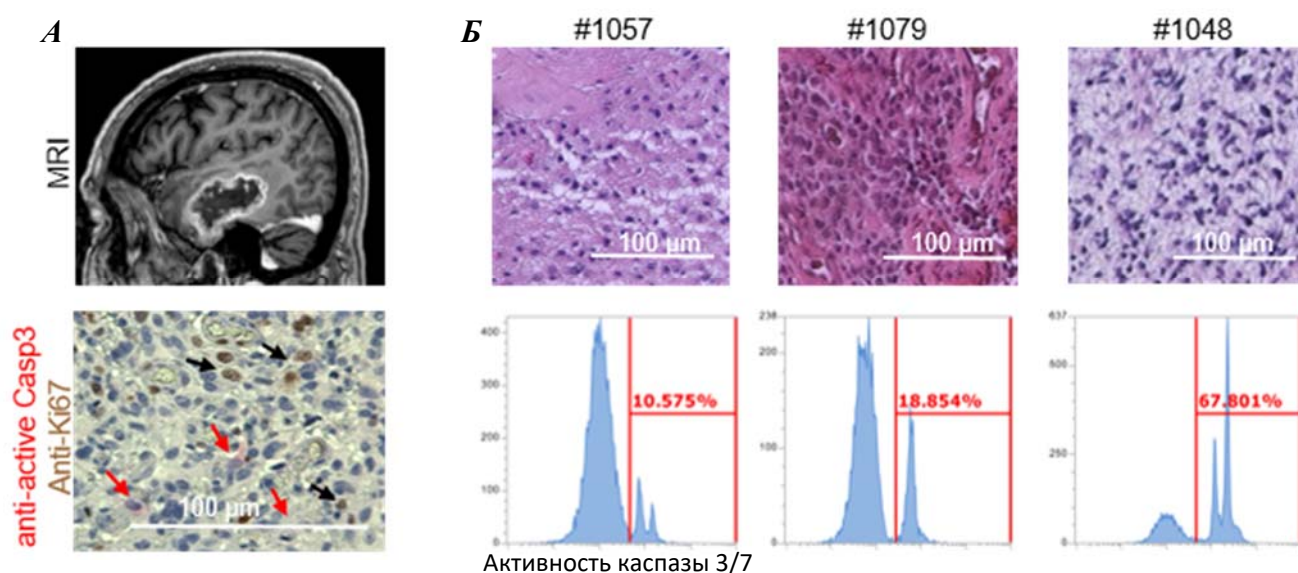


Рис. 14. А – МРТ пациента с глиобластомой (сверху) и окраска среза глиобластомы человека антителами на маркёр апоптоза (активированная каспазу-3) и маркёр пролиферации (Ki67) (снизу). Б – Окраска гематоксилином и эозином срезов глиобластомы, полученных от трёх различных пациентов, (сверху) и определение уровня апоптоза методом проточной цитофлуориметрии в соответствующих опухолях (снизу).

Для подтверждения такой гипотезы в первую очередь мы определили содержание апоптотических клеток в глиобластомах, полученных от пяти разных пациентов. Важно отметить, что время от хирургического удаления опухоли до анализа клеток никогда не превышало 4х часов. Из **рисунка 14Б** видно, что апоптотические клетки составляют от 10% до 70% всех опухолевых клеток, что говорит о потенциально большом влиянии этих клеток на «здоровые» опухолевые клетки.

Следующим шагом мы решили подтвердить на глиобластоме данные, которые были получены ранее на раке яичника. Для этого мы выделили везикулы, секретированные первичной культурой «здоровых» клеток глиобластомы (далее такие везикулы мы обозначаем как “EVs”) и апоптотическими клетками глиобластомы от того же пациента (далее такие

везикулы мы обозначаем как “apoEVs”). LC-MS/MS анализ показал, что apoEVs действительно обогащены сплайсосомными белками (**Рис. 15А**). Мы подтвердили эти данные с помощью иммуноблотинга с антителами на 7 различных сплайсосомных белков (PRPF8, U2AF2, SF3A3, SF3B1, HNRNPU, HNRNPA2B1, HNRNPC) и 5 маркёров экзосом (Alix, CD9, CD63, CD81, TSG101). Кроме того, мы показали, что apoEVs обогащены всеми типами сплайсомных U РНК (U1, U2, U4, U5, U6, U11, U12, U4^{ATAC}, U6^{ATAC}) и не обогащены U РНК, не относящимися к сплайсосоме (U7 и U8) (**Рис. 15Б**). Также мы показали, что короткая (10 часов) инкубация apoEVs с клетками существенно увеличивает уровень сплайсосомных U РНК и некоторых сплайсосомных белков в реципиентных клетках. Наконец, мы выделили везикулы из плазмы крови пациентов с глиобластомой до и после терапии и продемонстрировали, что для большинства больных характерно существенное увеличение количества сплайсосомного белка U2AF2 в везикулах, полученных после лечения (**Рис. 15В**).

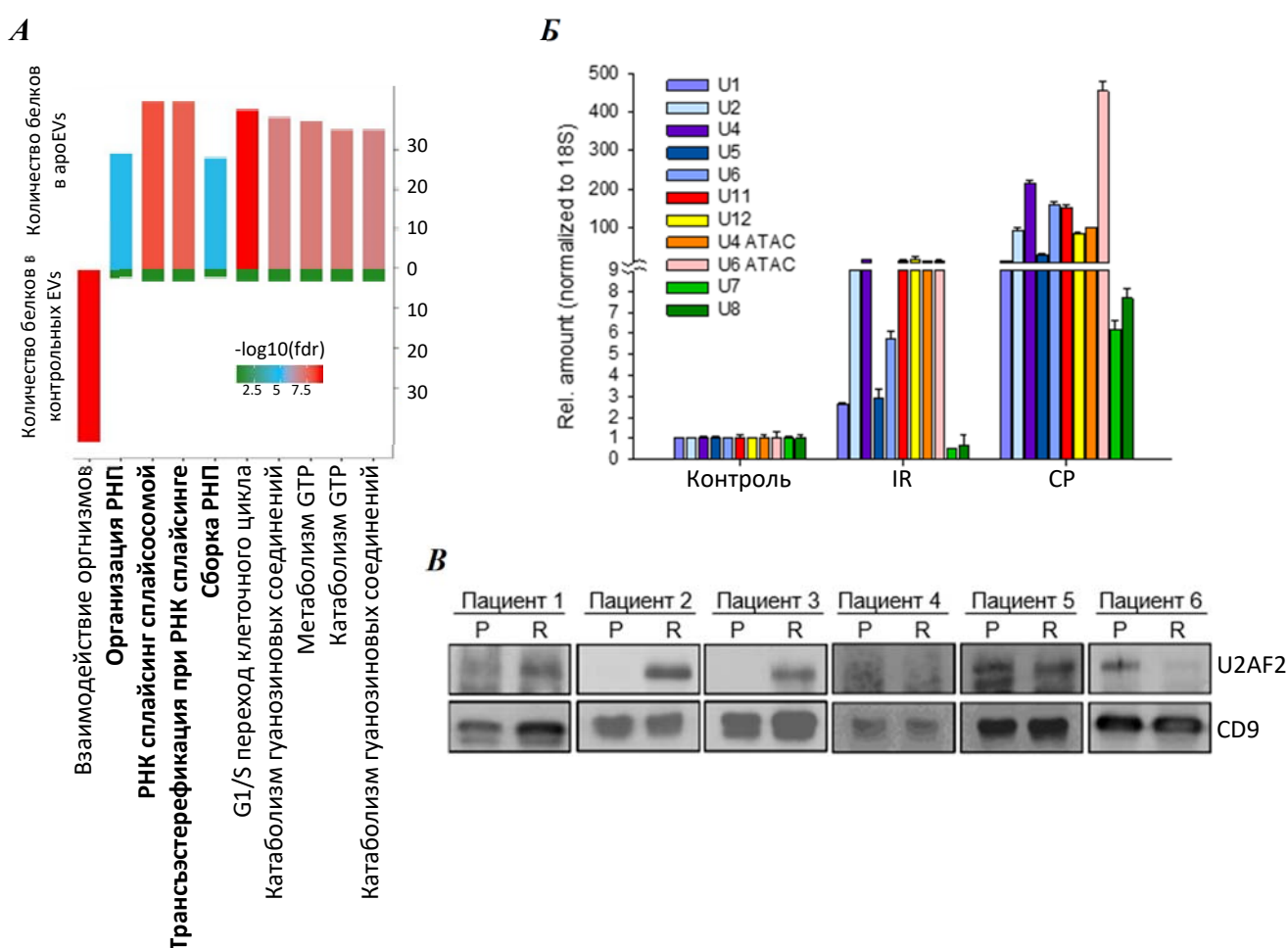


Рис. 15. **А** – Анализ обогащения белков, идентифицированных в везикулах, секретируемых контрольными и апоптотическими клетками глиобластомы. **Б** – Относительное содержание РНК сплайсосомы (U1, U2, U4, U5, U6, U11, U12, U4^{ATAC} и U6^{ATAC}), а также контрольных РНК (U7, U8) в везикулах, секретированных контрольными клетками глиобластомы, клетками глиобластомы, обработанными γ -излучением (IR), и клетками глиобластомы, обработанными цисплатином (CP). **В** – Содержание белка U2AF2 в везикулах, выделенных из плазмы крови пациентов с глиобластомой до (P) и после (R) терапии.

Данные, перечисленные выше, подтверждают наше предположение о том, что апоптотические клетки глиобластомы секретируют везикулы, обогащённые сплайсосомами, и эти везикулы по набору поверхностных маркёров, размеру и условиям седиментации сходны с экзосомами.

Обнадёженные этими результатами мы приступили к исследованию наиболее интересного для нас вопроса. Дело в том, что сплайсосомы в норме имеют исключительно ядерную локализацию, и до настоящего момента не было данных о том, что они могут покидать ядро и тем более экспортироваться из клетки. Используя первичные культуры клеток глиобластомы *in vitro*, оверэкспрессирующие флуоресцентно-меченные белки, мы показали, что на ранних стадиях апоптоза сплайсосомный белок PRPF3 диссоциирует от белка ядерного матрикса Коилина и перемещается в цитоплазму (Рис. 16А). Аналогичные результаты были получены с помощью окрашивания антителами эндогенных сплайсосомных белков SF3B1, HNRNPU и HNRNPA2B1. Чтобы подтвердить эти данные, мы использовали метод FISH и показали, что U6 сплайсосомная РНК также перемещается в цитоплазму при индукции апоптоза (Рис. 16Б). Наконец, мы окрасили срезы человеческой глиобластомы антителами на ранний маркёр апоптоза – фосфорилированный гистон H2AX, а также на различные сплайсосомные белки (U2AF2, PRPF8 и NONO) и продемонстрировали, что в апоптотических клетках *in vivo* сплайсосомные белки локализуются в цитоплазме, в то время как в «здоровых» опухолевых клетках они располагаются исключительно в ядре (Рис. 16В).

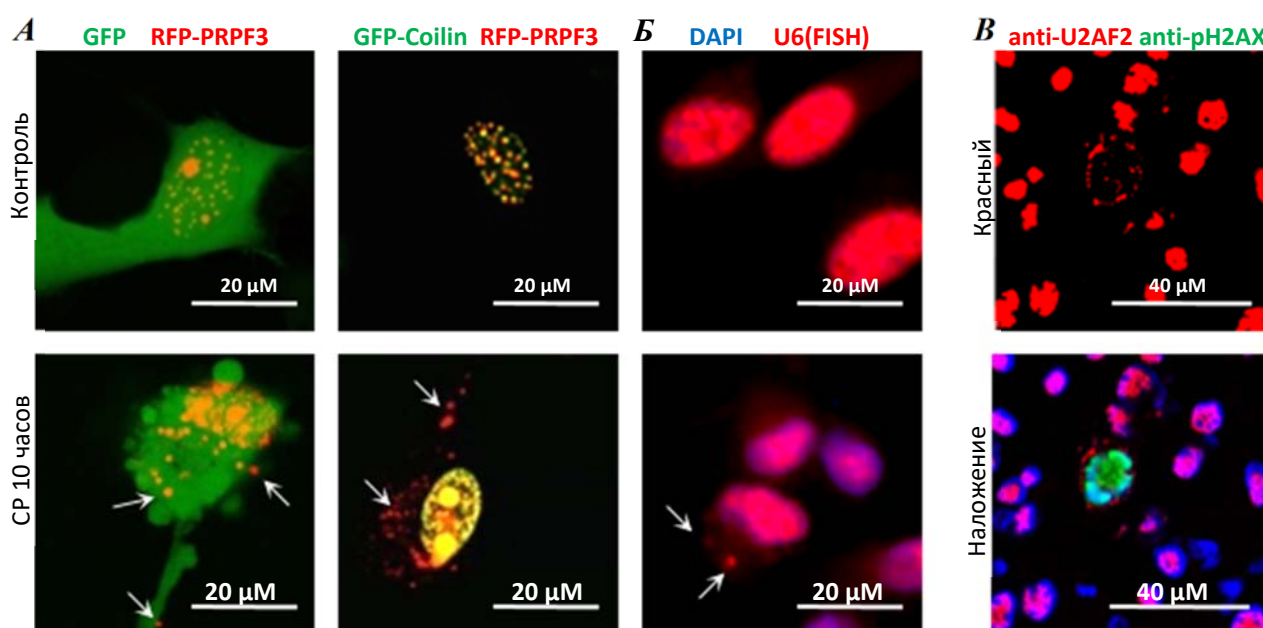


Рис. 16. А – Флуоресцентные микрофотографии клеток глиобластомы, коэкспрессирующих GFP и RFP-PRPF3 (слева) или GFP-Coilin и RFP-PRPF3 (справа) до и после их обработки цисплатином. Б – Флуоресцентные микрофотографии клеток глиобластомы, обработанных и не обработанных цисплатином и затем окрашенных флуоресцентно-меченым зондом к U6 РНК. В - Флуоресцентные микрофотографии срезов глиобластомы человека, окрашенных антителами к белку U2AF2 и фосфорилированному гистону H2AX.

Следующим шагом мы попытались установить молекулярный механизм экспорта сплайсосом из ядра клетки. В первую очередь мы подтвердили, что этот процесс не связан с нарушением целостности ядерной оболочки. Далее мы показали, что для экспорта сплайсосомных белков необходима активация каспаз, и добавление ингибитора каспаз zVAD(OMe)fmk приводит к исчезновению сплайсосомных белков из везикул (**Рис. 17А**). Анализируя данные иммуноблотов и масс-спектрометрии, мы заметили, что сплайсосомный белок HNRNPU присутствует в везикулах только в расщеплённой каспазами форме (**Рис. 17Б**). Этот белок важен для закрепления сплайсосом на ядерном матриксе. HNRNPU состоит из двух доменов, одним из которых он взаимодействует с хроматином, а другим со сплайсосомой. Между этими доменами располагается сайт расщепления каспазами (SALD) (**Рис. 17В**). Мы предположили, что расщепление HNRNPU приведёт к потере взаимодействия сплайсосом с ядерным матриксом и позволит им выйти из ядра в цитоплазму. Чтобы проверить эту гипотезу, нами была создана плазмида, кодирующая HNRNPU на N- и C- концах которого располагаются YFP и CFP соответственно (**Рис. 17В**).

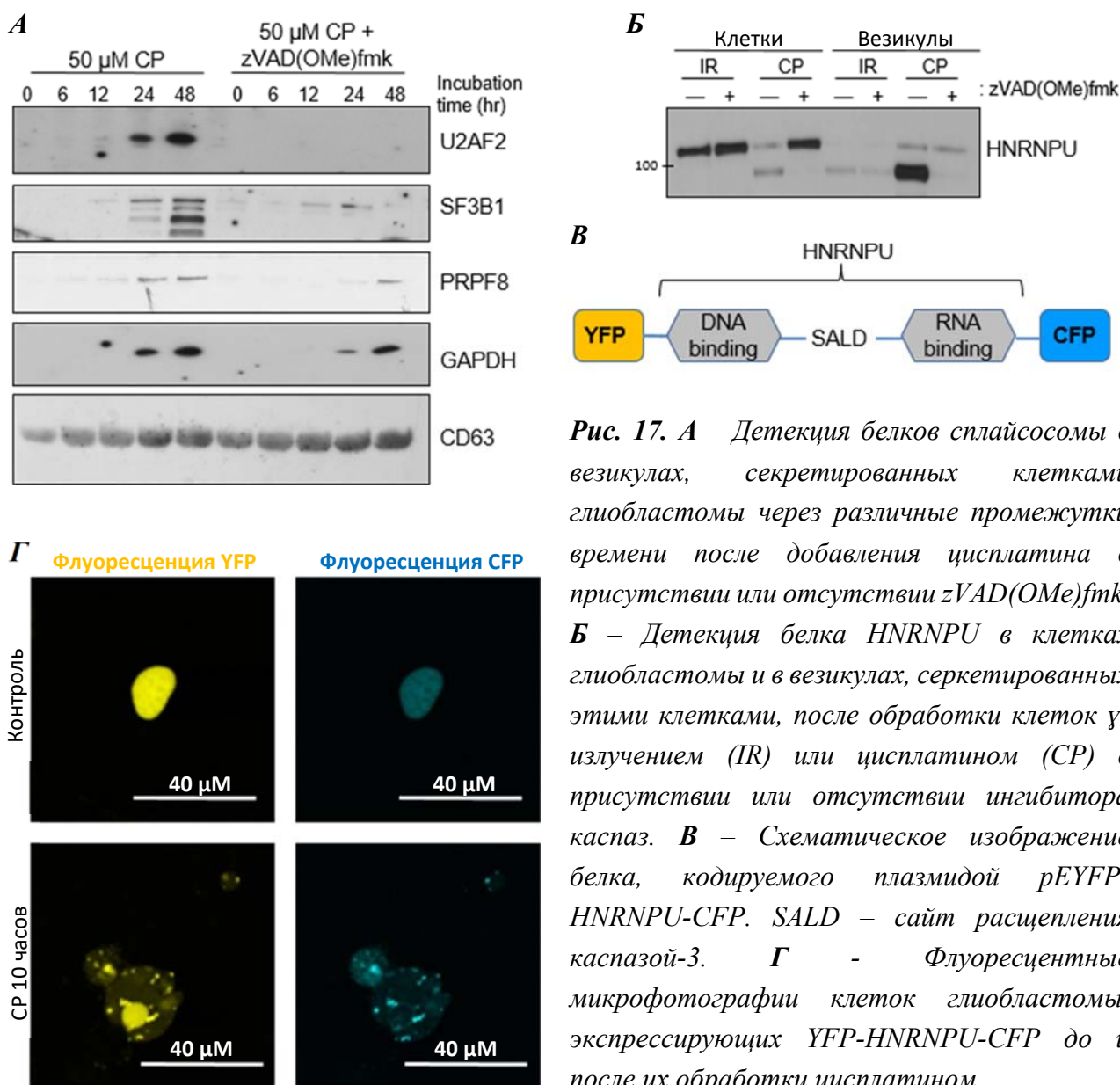


Рис. 17. *А* – Детекция белков сплайсосомы в везикулах, секретированных клетками глиобластомы через различные промежутки времени после добавления цисплатина в присутствии или отсутствии zVAD(OMe)fmk. *Б* – Детекция белка HNRNPU в клетках глиобластомы и в везикулах, секретированных этими клетками, после обработки клеток γ -излучением (IR) или цисплатином (CP) в присутствии или отсутствии ингибитора каспаз. *В* – Схематическое изображение белка, кодируемого плазмидой pEYFP-HNRNPU-CFP. SALD – сайт расщепления каспазой-3. *Г* – Флуоресцентные микрофотографии клеток глиобластомы, экспрессирующих YFP-HNRNPU-CFP до и после их обработки цисплатином.

Из **рисунка 17Г** видно, что в контрольных клетках флуоресценция YFP и CFP полностью колокализуется, однако после индукции апоптоза хроматин-связывающий домен, меченный CFP, остаётся в ядре, а РНК-связывающий домен, меченный YFP, покидает ядро.

Приведённые выше результаты говорят о том, что при индукции апоптоза HNRNPU расщепляется каспазами, и С-концевая часть этого белка, взаимодействующая со сплайсосомой, покидает ядро. Таким образом, можно предположить, что одним из механизмов экспорта сплайсосом в цитоплазму апоптотических клеток является расщепление белков, ответственных за прикрепление сплайсосом к ядерному матриксу.

2.3. apoEVs изменяют тип сплайсинга пре-мРНК и способствуют мезенхимальной трансформации реципиентных клеток глиобластомы.

После того как мы подтвердили, что апоптотические клетки секретируют везикулы, обогащённые компонентами сплайсосом, мы заинтересовались вопросом о биологической роли этих везикул в развитии опухолей головного мозга. Одной из главных загадок в поведении глиобластом является то, что на ранней стадии они все обладают мало агрессивным пронеурональным фенотипом, однако после терапии часто приобретают намного более агрессивный мезенхимальный фенотип. Кроме того, пронеуронально-мезенхимальный переход может происходить и спонтанно по мере роста опухоли. В обоих случаях причины этой трансформации до сих пор остаются загадкой.



Рис. 18. **А** - Диаграмма Венна, иллюстрирующая различия в сплайсинге обнаруженные в трёх сравнениях: различия между пронеурональными и мезенхимальными клетками (голубой); различия между пронеурональными клетками, культивированными со средой, содержащей везикулы от апоптотических и не апоптотических клеток (розовый); различия между пронеурональными клетками, культивированными с фильтрованной или нефильтованной средой от апоптотических клеток (оранжевый). **Б** - Анализ обогащения генов, сплайсинг которых был изменён во всех трёх сравнениях. **В** - Тепловая карта, иллюстрирующая различия в экспрессии пронеурональных (зелёный) и мезенхимальных (красный) маркёров в контрольных клетках, клетках, обработанных apoEVs, и в клетках, обработанных EVs от «здоровых» клеток доноров.

Чтобы узнать могут ли сплайсосомные белки внутри ароEVs влиять на сплайсинг пре-мРНК в реципиентных клетках, и в особенности связаны ли эти изменения с пронейронально-мезенхимальным переходом, мы использовали метод глубокого сиквенирования транскриптома. Вначале мы провели сиквенирование полиаденилированной РНК, выделенной из трёх мезенхимальных и трёх пронейрональных первичных клеточных линий. Проанализировав полученные результаты, мы впервые установили различия в альтернативном сплайсинге между клетками пронейронального и мезенхимального фенотипа глиобластомы. В общей сложности мы обнаружили отличия в сплайсинге пре-мРНК, относящихся к 5297 генам, среди которых были такие важные опухолеассоциированные гены, как MDM2, MDM4, FoxM1, hRAS, Notch1, ATM, TGM2, PKM, Drosha и другие. Следующим шагом мы провели сиквенирование РНК в клетках глиобластомы, культивированных в течение 48 часов с контрольными EVs или с ароEVs. Чтобы убедиться, что изменения в сплайсинге вызваны именно везикулами, а не другими молекулами, секретируемыми апоптотическими клетками, в качестве дополнительного контроля мы добавляли к реципиентным клеткам среду от апоптотических клеток, из которой везикулы были удалены с помощью фильтрации. Сравнив данные РНК сиквенирования, мы обнаружили, что ароEVs способствуют появлению в реципиентных клетках изоформ, характерных для мезенхимального фенотипа глиобластомы (**Рис. 18А**). Проанализировав функции генов, сплайсинг которых меняется под действием ароEVs, мы показали, что эти гены регулируют репарацию ДНК и ответ клетки на стресс (**Рис. 18Б**). Таким образом, можно предположить, что раковые клетки, погибающие при неблагоприятных воздействиях (в нашем случае γ -излучение), выделяют везикулы, которые позволяют соседним выжившим клеткам «подготовиться» к последующему стрессу, за счёт изменений в сплайсинге пре-мРНК соответствующих генов. Чтобы подтвердить, что изменения сплайсинга, вызванные ароEVs, приводят к мезенхимальной трансформации, мы провели ещё один эксперимент по сиквенированию транскриптома. Однако, в данном случае клетки глиобластомы инкубировались с везикулами в течение 4х, а не 2х дней для того, чтобы установить, как изменение сплайсинга повлияет на транскрипцию нижележащих генов. Проанализировав экспрессию фенотипических маркёров, мы подтвердили, что ароEVs действительно снижают экспрессию маркёров пронейронального фенотипа и увеличивают экспрессию маркёров мезенхимального фенотипа в клетках глиобластомы (**Рис. 18В**).

Далее мы провели серию экспериментов чтобы детально изучить влияние ароEVs на фенотип реципиентных клеток глиобластомы. Наши данные продемонстрировали, что ароEVs ускоряют рост клеток глиобластомы, полученных от различных пациентов, как *in vitro*, так и *in vivo*. Коинъекция ароEVs в мозг иммунодефицитным мышам вместе с клетками глиобластомы человека значительно снижала выживаемость животных (**Рис. 19А**) и ускоряла рост опухоли (**Рис. 19Б**). Анализ образованных опухолей показал, что ароEVs, введённые вместе с клетками глиобластомы в мозг мышам, вызывают сильнейшее изменение фенотипа опухоли, превращая её в мезенхимальную (**Рис. 20А**). Другой яркой особенностью опухолей, сформированных в присутствии ароEVs, является их высокая инвазивность. Как видно из **рисунка 20Б**, контрольные мыши имели крайне характерную для пронейрональных опухолей чёткую границу между опухолевой и нормальной тканью, однако, клетки, введённые вместе с ароEVs, глубоко мигрировали в нормальный мозг животного.

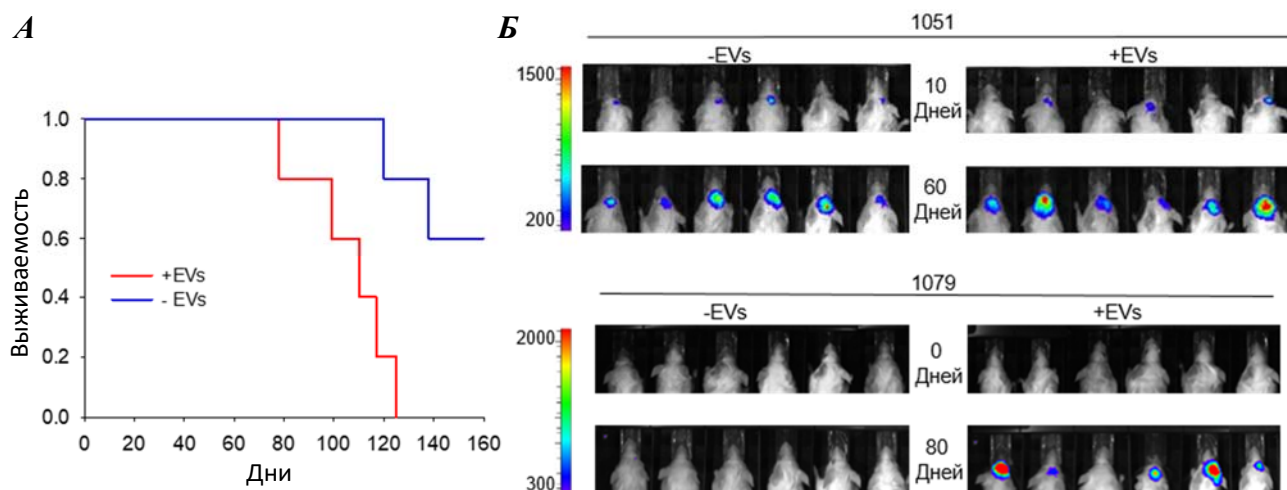


Рис. 19. *А* – Кривые Каплан-Майера, показывающие выживаемость иммунодефицитных мышей, в мозг которых были введены клетки глиобластомы человека (синие) или смесь клеток глиобластомы с ароEVs (красное). *Б* - Репрезентативные изображения биолуминисценции в мозге мышей, которым были трансплантированы меченные люциферазой клетки глиобластомы человека в присутствии или отсутствии ароEVs. В эксперименте использовались клетки, полученные от двух различных пациентов (1051 и 1079).

Чтобы подтвердить, что ароEVs действительно ускоряют миграцию опухолевых клеток, мы измерили скорость передвижения единичных клеток по наноструктурированной поверхности и показали, что преинкубация с ароEVs более чем в 3 раза увеличивает подвижность клеток глиобластомы *in vitro* (**Рис. 20В**), что также является характерным признаком мезенхимальной трансформации.

Однако, наиболее важной отличительной чертой мезенхимальных опухолевых клеток является тип их метаболизма. Для мезенхимальных клеток характерен так называемый эффект Варбурга – сдвиг метаболизма от окислительного фосфорилирования к аэробному гликолизу. Чтобы сравнить интенсивность аэробного гликолиза в контрольных клетках и в клетках глиобластомы преинкубированных с ароEVs, мы измеряли скорость закисления среды при последовательном добавлении олигомицина (ингибитор АТФ-синтетазы) и 2-дезоксиглюкозы (ингибитор гликолиза). Из **рисунка 20Г** видно, что уже четырёх дней преинкубации с ароEVs достаточно для более чем 2х кратного увеличения уровня аэробного гликолиза в нормальных условиях и более чем 4х кратного увеличения резервных возможностей клетки к гликолизу. При этом изменений в уровне окислительного фосфорилирования замечено не было. Такие данные говорят о драматическом эффекте ароEVs на метаболизм реципиентных клеток.

Наконец, в заключении мы исследовали влияние ароEVs на чувствительность клеток глиобластомы к γ -излучению и таким противоопухолевым препаратам, как цисплатин и темозоламид. Из **рисунка 20Д** видно, что преинкубация с ароEVs значительно увеличивает устойчивость глиобластомы к этим видам терапии. Хочется особенно отметить, что доза облучения в 12 Гр вызывала гибель всех контрольных клеток, однако почти 20% клеток, преинкубированных с ароEVs, сохраняли жизнеспособность. Такая повышенная резистентность также является важной чертой мезенхимальных клеток глиобластомы.

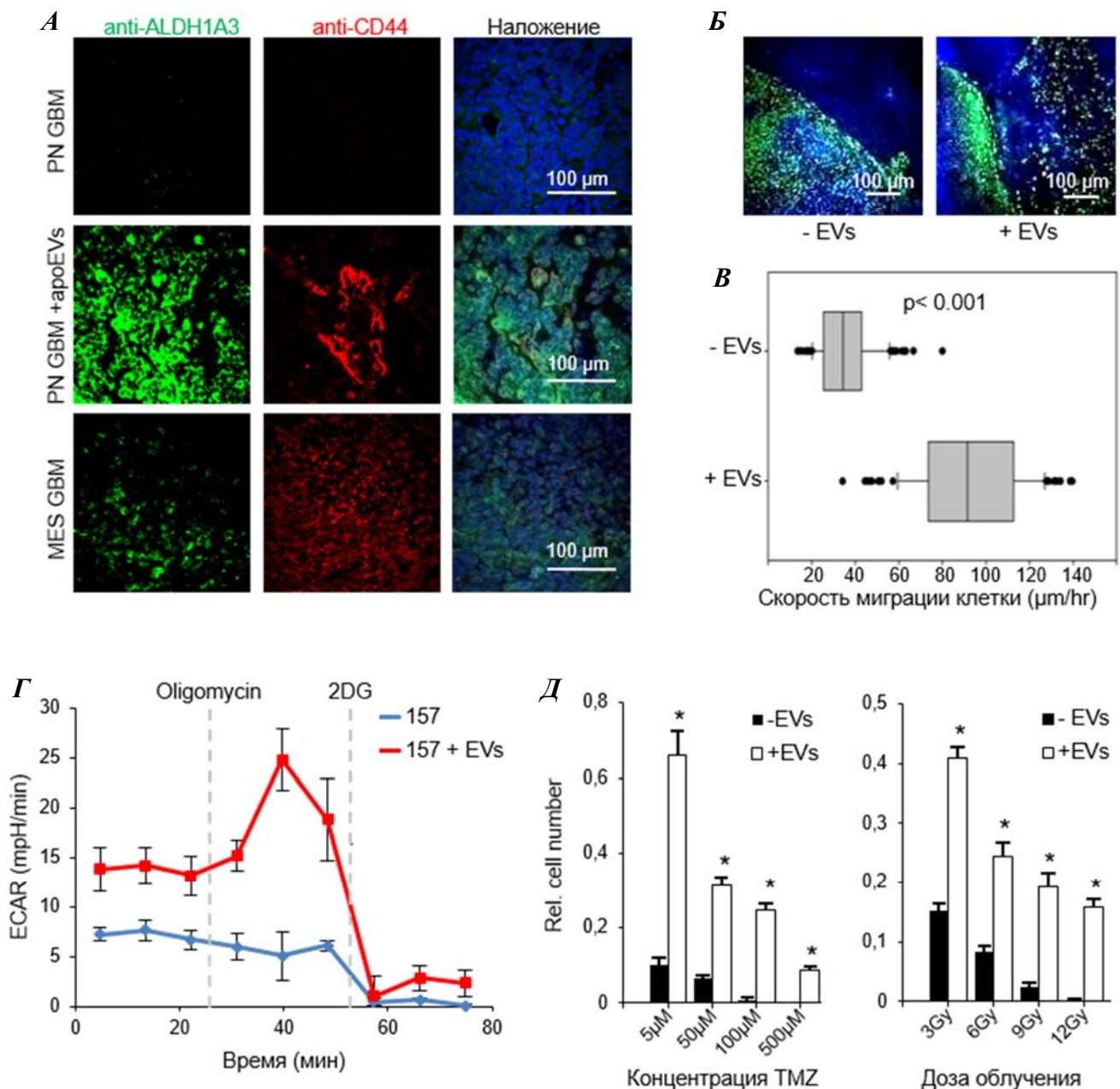


Рис. 20. *А* – Срезы мозга мышей, которым были введены клетки глиобластомы человека или смесь клеток глиобластомы и apoEVs. Срезы были получены через 4 месяца после инъекции клеток и окрашены антителами ALDH1A3 и CD44. Опухоль, образованная мезенхимальными клетками, использовалась в качестве положительного контроля. *Б* – Окраска срезов, полученных так же, как и в «А» антителами на человеческий ядерный антиген. *В* – Скорость движения единичных клеток глиобластомы, преинкубированных 4 дня с apoEVs или с контрольной средой. *Г* – Скорость закисления среды (ECAR) клетками глиобластомы, преинкубированными 4 дня с apoEVs или с контрольной средой. Олигомицин добавлялся для определения максимально возможной интенсивности гликолиза, а 2-дезоксиглюкоза для определения не гликолитического закисления среды. *Д* – Влияние темозоламида (TMZ) и γ-излучения (IR) на выживаемость клеток глиобластомы, преинкубированных 4 дня с apoEVs или с контрольной средой.

2.4. Белок RBM11 секретируется апоптотическими клетками внутри апоEVs и частично отвечает за эффект этих везикул на реципиентные клетки глиобластомы.

Получив результаты о том, что сплайсосомные комплексы внутри апоEVs способствуют мезенхимальной трансформации реципиентных клеток, мы решили определить, какой именно белок сплайсосомы ответственен за этот эффект. Необходимо отметить, что сплайсинг молекул РНК осуществляется при совместном действии коровых белков сплайсосомы и, так называемых, сплайсинговых факторов. Коровые белки экспрессируются на высоком уровне во всех человеческих клетках и осуществляют химическую реакцию сплайсинга пре-мРНК. В отличие от них, сплайсинговые факторы определяют то, как именно будет сплайсирована та или иная молекула пре-мРНК и обладают крайне тканеспецифичной экспрессией. Трудно предположить, что наблюдаемые нами изменения сплайсинга могли быть вызваны незначительным увеличением общего количества сплайсосом благодаря поступлению дополнительных сплайсосом в реципиентные клетки из апоEVs. Более вероятно, что апоEVs переносят некоторые «необычные» сплайсинговые факторы, которые не присутствуют или присутствуют на очень низком уровне в реципиентных клетках.

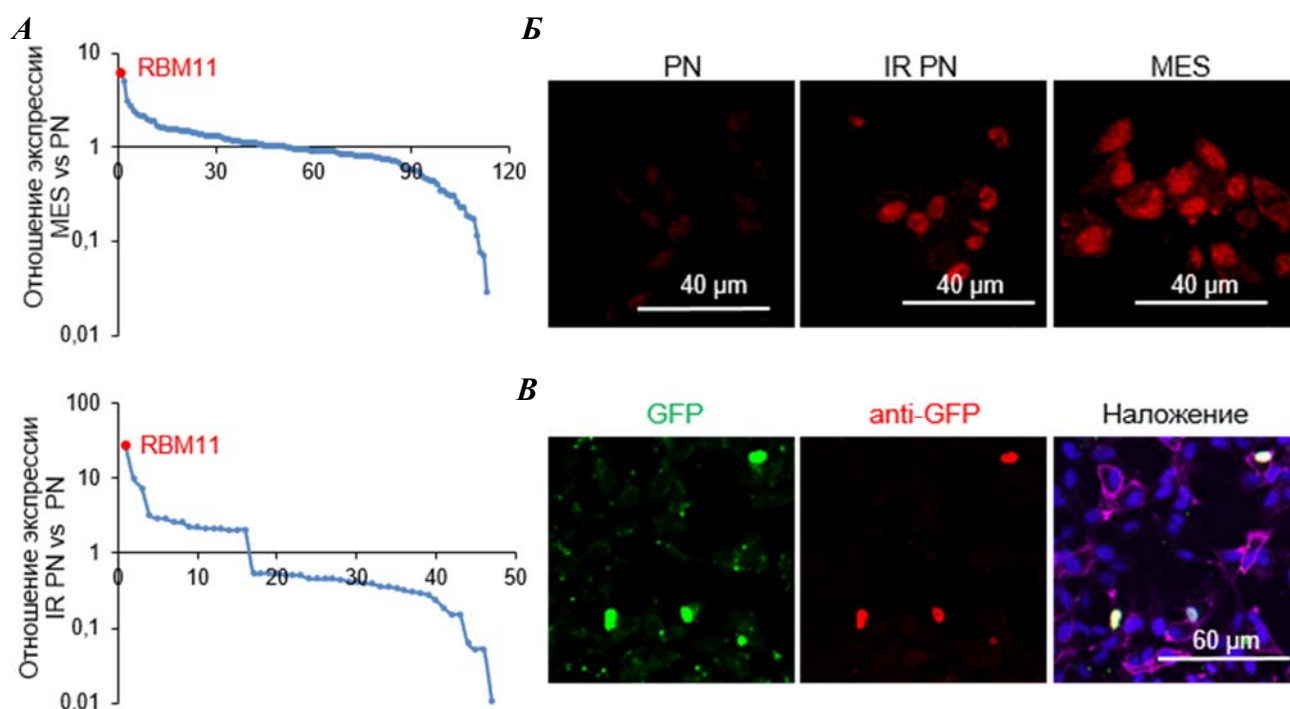


Рис. 21. *А* – Отношение экспрессии генов-регуляторов сплайсинга в мезенхимальных и пронейрональных клетках глиобластомы (сверху) и в апоптотических и не апоптотических пронейрональных клетках глиобластомы (снизу). *Б* – Окрашивание контрольных (PN) и облученных летальной дозой γ -излучения (IR PN) пронейрональных клеток глиобластомы антителами на RBM11. Мезенхимальные клетки (MES) использовались в качестве положительного контроля. *В* – Флуоресценция GFP, а также окраска антителами на GFP немеченых клеток глиобластомы, к которым были добавлены везикулы, от апоптотических клеток глиобластомы, стабильно экспрессирующих GFP-RBM11.

Чтобы проверить нашу гипотезу мы исследовали, как меняется экспрессия сплайсинговых факторов при индукции апоптоза, а также сравнили количества этих белков в

пронейрональных и мезенхимальных клетках глиобластомы. Метод микрочипов показал, что при индукции апоптоза наиболее сильно увеличивается экспрессия гена RBM11 (более чем в 30 раз) (**Рис. 21А** сверху). Удивительно, но именно RBM11 также является и сплайсинговым фактором наиболее специфичным для мезенхимальных клеток глиобластомы (**Рис. 21А** снизу). Таким образом, можно утверждать, что индукция апоптоза приводит к тому, что пронеурональные (менее агрессивные) клетки глиобластомы начинают экспрессировать сплайсинговые факторы характерные для мезенхимальных (более агрессивных) клеток. Мы подтвердили эти данные с помощью методов иммуноблотинга, qRT-PCR, бисульфитного секвенирования промотора RBM11 и иммунофлуоресцентного окрашивания пронеурональных клеток до и после индукции апоптоза (**Рис. 21Б**). Далее, мы создали клеточные линии, стабильно экспрессирующие GFP-RBM11, и после индукции апоптоза выделили везикулы, секретируемые этими клетками. Добавив такие везикулы к немеченым клеткам глиобластомы, мы показали, что RBM11 действительно может переноситься от апоптотических клеток доноров к «здоровым» реципиентным клеткам с помощью везикул. Важно отметить, что RBM11 не подвергался деградации и попадал в ядро клеток реципиентов (**Рис. 21В**). Мы подтвердили эти данные методами иммуноблотинга и проточной цитофлуориметрии, показав, что захват апоEVs, действительно, значительно увеличивает количество белка RBM11 в реципиентных клетках.

Чтобы более детально исследовать функции белка RBM11, мы создали пронеурональные клетки глиобластомы с повышенной экспрессией RBM11 и мезенхимальные клетки глиобластомы с пониженной экспрессией этого гена. Исследование полученных клеточных линий показало, что повышенная экспрессия RBM11 увеличивает скорость миграции, уровень мезенхимальных маркеров (**Рис. 22А**) и интенсивность аэробного гликолиза (**Рис. 22Б**) в пронеурональных клетках. Напротив, понижение экспрессии RBM11 в мезенхимальных клетках с помощью shRNA приводит к уменьшению уровня мезенхимальных маркеров (**Рис. 22В**), увеличению экспрессии пронеурональных маркеров (**Рис. 22Г**) и, самое главное, к значительному увеличению чувствительности клеток к радиотерапии (**Рис. 22Д**).

Чтобы изучить молекулярный механизм действия экзогенного RBM11 на опухолевые клетки, мы определили уровни экспрессии генов в созданных нами клеточных линиях с помощью микрочипов. Анализ полученных данных методом GSEA (Gene Set Enrichment Analysis) показал, что повышение экспрессии RBM11 в пронеурональных клетках приводит к активации перехода G1/S фаз клеточного цикла (**Рис. 23А** сверху), а понижение экспрессии RBM11 в мезенхимальных клетках приводит к активации клеточной гибели (**Рис. 23А** снизу). Далее мы использовали метод РНК иммунопреципитации и определили молекулы РНК с которыми взаимодействует белок RBM11. Как и ожидалось, мы подтвердили, что RBM11 образует комплексы с некодирующими уридин богатыми РНК сплайсосомы (U1, U11 и U5) и не связывается с 18S рРНК и мРНК, кодирующей GAPDH. Кроме того, наш эксперимент продемонстрировал взаимодействие RBM11 с мРНК, кодирующими белки MDM4 и Циклин D1 (**Рис. 23Б** и **23В**). Основываясь на этих результатах, мы предположили, что RBM11 может регулировать сплайсинг MDM4 и Циклина D1. MDM4 имеет 2 хорошо описанных изоформы: MDM4s (короткая) и MDM4f (полноразмерная). Было показано, что короткая изоформа является сильным онкогеном, защищает клетки от апоптоза и более чем в 10 раз ускоряет

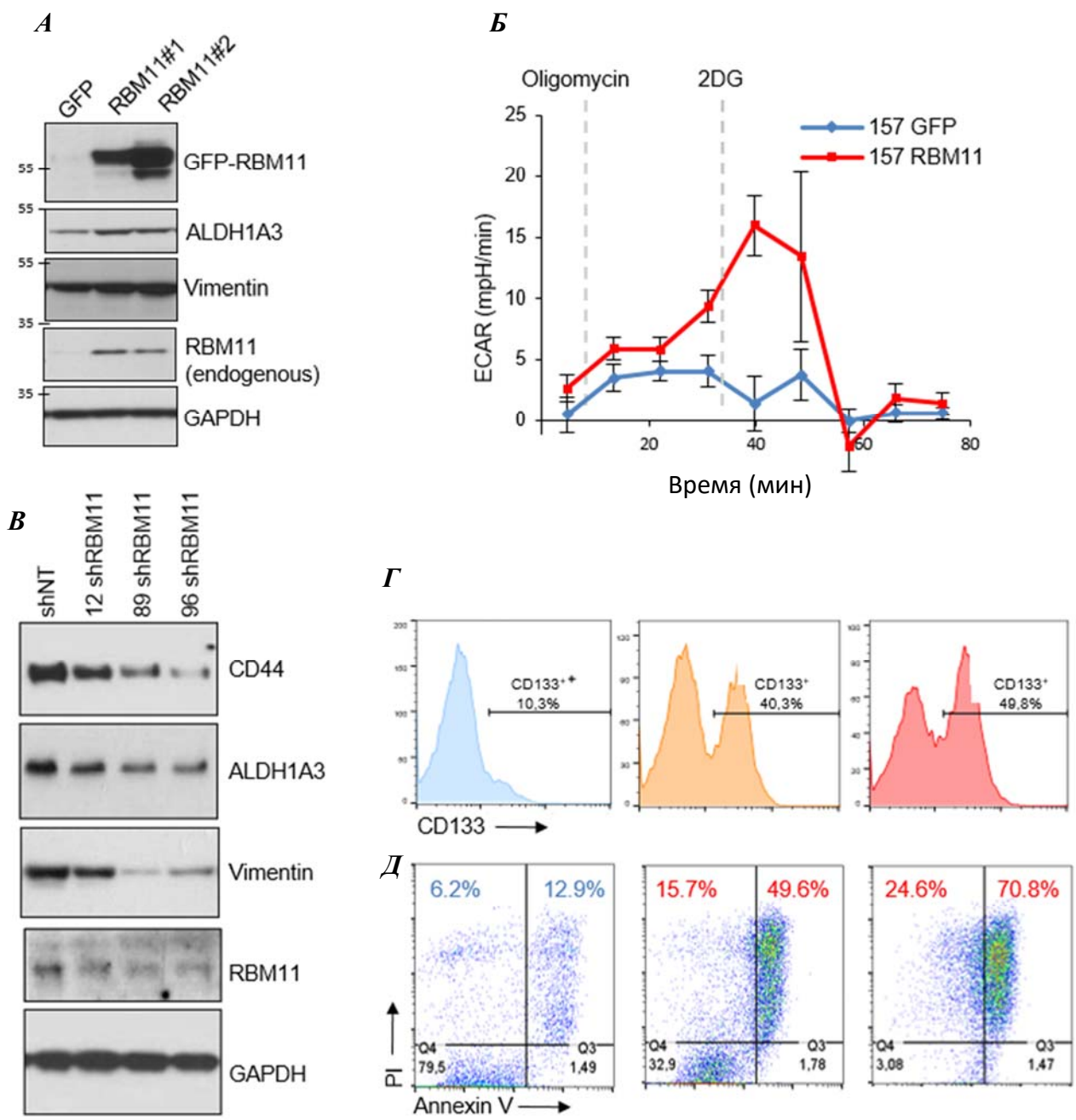


Рис. 22. *А* – Детекция мезенхимальных маркёров в пронейрональных клетках глиобластомы экспрессирующих экзогенный *GFP* или *RBM11*. *Б* – Скорость закисления среды (*ECAR*) пронейрональными клетками глиобластомы, экспрессирующими экзогенный *GFP* или *RBM11*. *В* – Детекция мезенхимальных маркёров в мезенхимальных клетках глиобластомы, экспрессирующих *shRNA* комплементарную *RBM11* или контрольную *shRNA*. *Г* – Уровень *CD133* (поверхностный маркёр пронейрональных клеток глиобластомы) в мезенхимальных клетках глиобластомы, экспрессирующих *shRNA* комплементарную *RBM11* или контрольную *shRNA*. *Д* – Уровень апоптоза после обработки мезенхимальных клеток глиобластомы, экспрессирующих *shRNA* комплементарную *RBM11* или контрольную *shRNA*, γ -излучением в дозе 12 Грей.

деградацию белка p53. Белок Циклин D1 также имеет две изоформы: Циклин D1a и Циклин D1b. Их функции не до конца понятны, однако известно, что Циклин D1a, в отличие от Циклин D1b, активирует систему чекпойнта клеточного цикла и способствует репарации ДНК. Сравнив экспрессию этих изоформ в пронеурональных и мезенхимальных клетках глиобластомы, мы убедились, что мезенхимальные клетки экспрессируют повышенное количество более онкогенных изоформ MDM4s и Циклин D1a. Не удивительно, что обработка пронеурональных клеток проEVs способствовала сдвигу равновесия сплайсинга в сторону продукции мезенхимальных MDM4s и Циклин D1a. В заключении мы исследовали, как изменение количества RBM11 повлияет на содержание этих изоформ в клетке. Наши результаты показали, что увеличение экспрессии RBM11 приводит к сдвигу сплайсинга в сторону продукции мезенхимальных изоформ MDM4s и Циклин D1a, а понижение экспрессии RBM11, напротив, смещает равновесие в сторону синтеза пронеурональных изоформ MDM4f и Циклин D1b.

Таким образом можно утверждать, что одним из молекулярных механизмов действия RBM11 на клетки глиобластомы является переключение сплайсинга пре-мРНК в сторону продукции специфичных для мезенхимальных клеток изоформ белков MDM4 и Циклин D1.

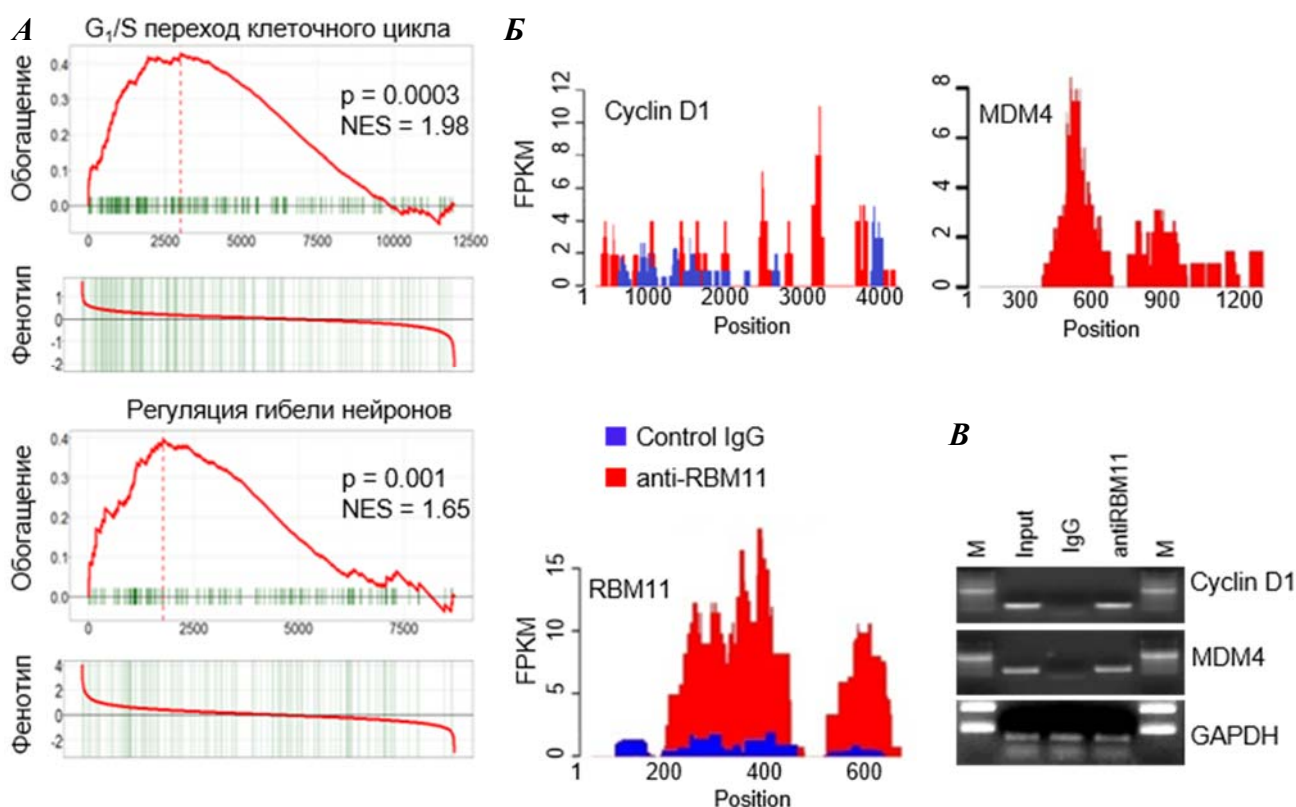


Рис. 23. *А* – GSEA анализ данных экспрессии генов в пронеурональных клетках глиобластомы, стабильно экспрессирующих GFP или GFP-RBM11 (сверху) и в мезенхимальных клетках глиобластомы, экспрессирующих shRNA комплементарную RBM11 или контрольную shRNA (снизу). *Б* - Профиль обогащения молекул РНК, преципитируемых с антителами против RBM11 (красный) или контрольными антителами (синий), полученный с помощью RIP-seq. *В* – Подтверждение данных RIP-seq с помощью ПЦР.

Во всех экспериментах, описанных выше, мы исследовали функции RBM11, используя клетки, оверэкспрессирующие этот белок. Однако, мы посчитали необходимым подтвердить полученные результаты для экзогенного RBM11, поступающего в клетки из апоEVs. С этой целью мы решили доказать, что нокдаун сплайсосомных белков в клетках-донорах везикул приведёт к ослаблению эффекта апоEVs на реципиентные клетки. Кроме RBM11 в качестве мишени для нокдауна нами также был выбран белок PRPF8, который является одним из основных структурных компонентов сплайсосомы и поэтому критически важен для сборки и функционирования всего сплайсосомного комплекса.

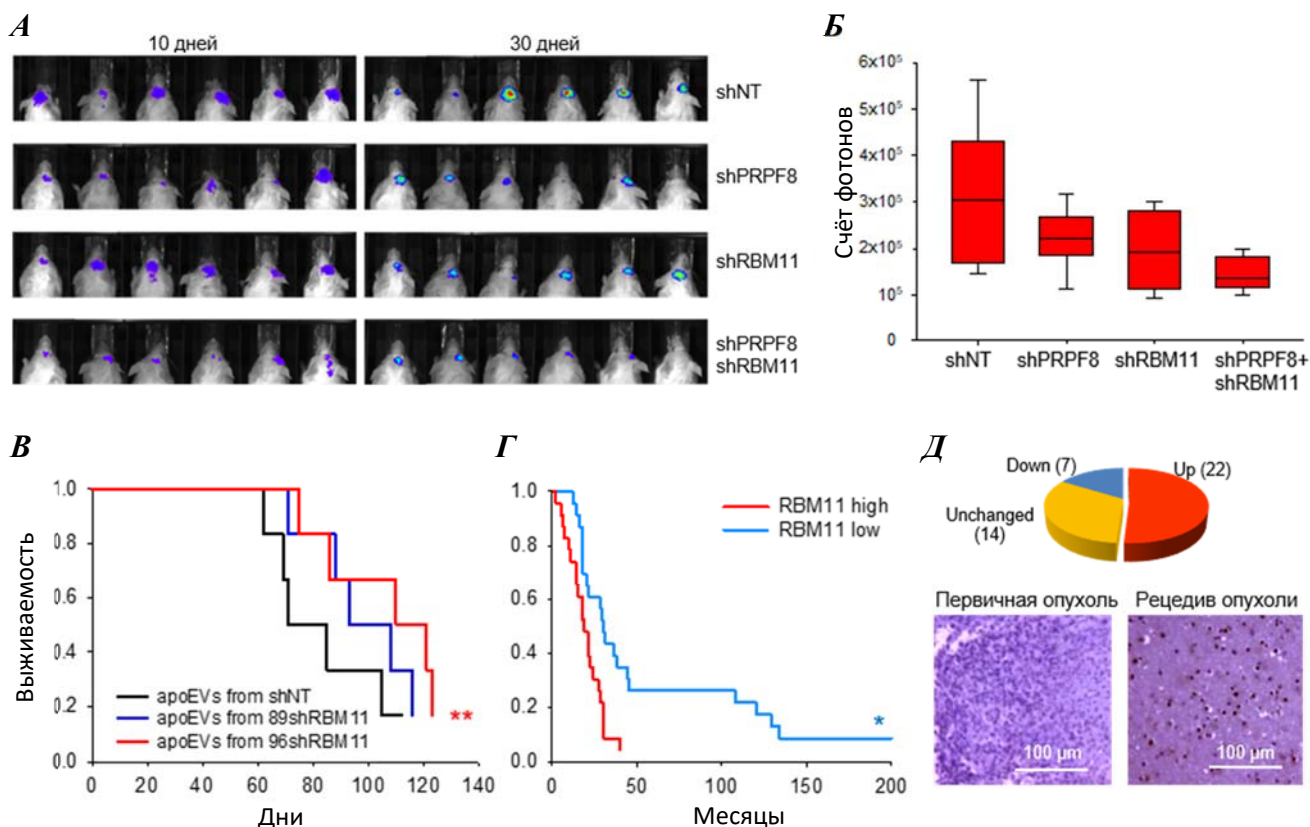


Рис. 24. *А* - Репрезентативные изображения биолуминисценции в мозге иммунодефицитных мышей, которым были трансплантированы «здоровые» меченные люциферазой клетки глиобластомы человека вместе с апоптотическими немечеными клетками глиобластомы, которые ранее были заражены лентивирусами, кодирующими контрольную shRNA (shRNA) или shRNA, комплементарную RBM11 (shRBM11) и/или PRPF8 (shPRPF8). *Б* - Количественная оценка биолуминисценции в мозге соответствующих мышей. *В* - Кривая Каплана-Мейера, демонстрирующая выживаемость мышей, в мозг которых были трансплантированы клетки глиобластомы человека вместе с везикулами, секретируемыми апоптотическими клетками глиобластомы, которые ранее были заражены лентивирусами, кодирующими контрольную shRNA (shRNA) или shRNA, комплементарную RBM11 (89shRBM11 или 96shRBM11). *Г* - Кривая Каплана-Мейера, показывающая выживаемость пациентов с глиобластомой, разделённых на 2 группы на основании интенсивности окрашивания опухолей антителами на RBM11 ($p=0.0018$). *Д* - Анализ интенсивности иммуногистохимического окрашивания антителами на RBM11 43х пар срезов глиобластом, полученных до и после лечения пациентов. Нижняя панель показывает репрезентативное окрашивание первичных и рецидивирующих опухолей.

Первым шагом мы получили клетки глиобластомы с пониженной экспрессией RBM11, PRPF8 или обоих белков сразу. Далее эти клетки использовались для двух различных экспериментов. В первом эксперименте мы определили эффект апоптотических клеток с нокдауном сплайсосомных белков на пролиферацию «здоровых» клеток глиобластомы. Для этого четырём группам животных, трансплантировали смесь «здоровых» меченных люциферазой клеток глиобластомы и немеченных апоптотических клеток с нокдауном RBM11 (1), PRPF8 (2), обоих белков сразу (3) или контрольных апоптотических клеток без нокдауна (4). Для индукции апоптоза немеченные клетки перед трансплантацией были облучены летальной дозой γ -излучения. Из **рисунков 24А и 24Б** видно, что нокдаун RBM11 и PRPF8 в апоптотических клетках существенно замедляет рост «здоровых» опухолевых клеток, а нокдаун обоих белков одновременно ведёт к ещё более заметному снижению пролиферативного эффекта апоптотических клеток. Во втором эксперименте мы сравнили эффект ароEVs, произведённых контрольными донорными клетками и донорными клетками с нокдауном RBM11. Для этого трём группам животных были трансплантированы клетки глиобластомы вместе с ароEVs, секретированными контрольными апоптотическими клетками (1) или апоптотическими клетками с нокдауном RBM11 (2 и 3; для нокдауна RBM11 использовалось две различные последовательности shRNA). Кривая Каплана-Мейера на **рисунке 24В** демонстрирует, что нокдаун RBM11 в клетках донорах ароEVs существенно снижает про-пролиферативный эффект этих везикул на реципиентные клетки.

Таким образом, основываясь на данных перечисленных выше, можно утверждать, что RBM11 действительно ответственен, по крайней мере частично, за эффект ароEVs на реципиентные клетки глиобластомы.

В заключении мы решили подтвердить клиническую значимость, полученных нами результатов. Для этого мы окрасили антителами на RBM11 срезы глиобластомы, полученные от более чем 100 различных пациентов, в том числе и парные образцы до и после терапии. Из **рисунка 24Г** видно, что повышенная экспрессия RBM11 коррелирует с плохим прогнозом для выживаемости пациентов, а, следовательно, и с более агрессивным фенотипом опухоли. Кроме того, анализ парных образцов подтвердил, что терапия (т.е. индукция апоптоза) действительно вызывает увеличение количества RBM11 у большинства пациентов (**Рис. 24Д**).

Суммируя все результаты, полученные при исследовании роли апоптотических клеток в прогрессии глиобластомы, нами была предложена следующая модель: терапия или недостаток питательных веществ, возникающий вследствие роста опухоли, вызывает появление большой популяции апоптотических клеток. В процессе апоптоза гибнущие клетки экспрессируют факторы сплайсинга, характерные для более агрессивного мезенхимального фенотипа глиобластомы. Эти сплайсосомные белки перемещаются из ядра в цитоплазму, где инкапсулируются внутрь мембранных пузырьков (везикул), которые транспортируют их в выжившие реципиентные клетки. Оказавшись в реципиентной клетке, сплайсосомные белки из везикул перемещаются в ядро, где меняют тип сплайсинга пре-мРНК в сторону продукции более онкогенных белковых изоформ. Все это увеличивает устойчивость реципиентных клеток к терапии, изменяет тип их метаболизма, ускоряет миграцию и, в конечном итоге, способствует приобретению ими более агрессивного мезенхимального фенотипа (**Рис. 25**).

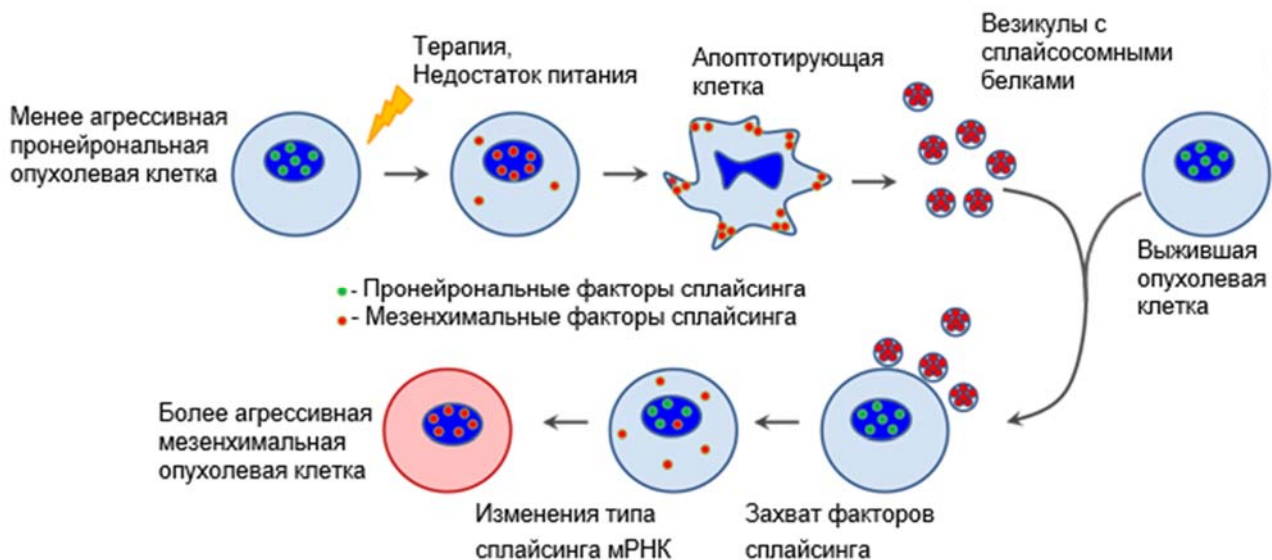


Рис. 25. Модель, иллюстрирующая предполагаемую роль сплайсосомных белков в передаче сигнала от апоптотических к выжившим клеткам глиобластомы.

3. Создание новых препаратов, направленно убивающих наиболее агрессивные популяции клеток глиобластомы.

Важным, хотя и совсем не удивительным, выводом из предыдущей главы является то, что стандартные методы лечения, такие как радиация и темозоламид, убивают лишь основную наименее резистентную популяцию опухолевых клеток. В процессе своей гибели эти клетки выделяют сигналы, которые увеличивают агрессивность и устойчивость к терапии у уже и без того более агрессивных выживших клеток. Как предотвратить такое возникновение резистентности? У этой проблемы существует два очевидных решения: создать препарат, который бы одномоментно убил все опухолевые клетки, не дав времени на изменение фенотипа, или разработать соединения, направленно убивающие небольшие, но наиболее агрессивные популяции клеток глиобластомы, не позволяя им сформировать новую устойчивую к терапии опухоль. Первый подход, на наш взгляд, вряд ли представляется возможным, потому мы решили сосредоточить наши усилия на втором – создании препаратов, уничтожающих наиболее агрессивные популяции клеток глиобластомы.

Отличительной чертой глиобластом является необычайная степень внутриопухолевой гетерогенности, которая от части возникает вследствие иерархической организации клеток. Не вдаваясь в подробности, можно сказать, что существуют более агрессивные и устойчивые к терапии стволовые клетки глиобластомы и менее агрессивные частично дифференцированные клетки. С другой стороны, разделяют более агрессивные мезенхимальные и менее агрессивные пронеурональные клетки, о которых упоминалось выше. Целью экспериментов, описанных далее, стало создание препаратов для направленного уничтожения стволовых клеток глиобластомы, а также мезенхимальных клеток глиобластомы.

3.1. Создание низкомолекулярного ингибитора киназы NEK2.

Данные приведённые выше свидетельствуют о том, что регуляция сплайсинга имеет ключевое значение для приобретения и поддержания агрессивного фенотипа клеток глиобластомы. К сожалению, лишь в редких случаях ингибиторы не обладающих энзиматической активностью белков, к которым относится RBM11, оказываются достаточно специфичны и эффективны для использования в клинической практике. По этой причине мы приняли решение создать низкомолекулярный ингибитор фермента, регулирующего сплайсинг пре-мРНК в опухолевых клетках. Наиболее удобными мишенями для подобных ингибиторов являются киназы, в силу уникальной структуры своих активных центров и, в большинстве случаев, высокой субстратной специфичности.

Анализ экспрессии генов показал, что среди всех 518ти киназ киназа NEK2 наиболее специфично экспрессируется в стволовых клетках глиобластомы и не экспрессируется в более дифференцированных нормальных и опухолевых клетках (**Рис. 26А**). Мы подтвердили этот результат с помощью сортировки клеток, окрашенных на CD133 (маркёр пронеурональных стволовых клеток глиобластомы) и ALDEFLUOR (маркёр мезенхимальных стволовых клеток глиобластомы), и последующего анализа экспрессии генов методом qRT-PCR. Из **рисунка 26Б** видно, что стволовые клетки глиобластомы обоих фенотипов экспрессируют киназу NEK2 на гораздо более высоком уровне, чем не стволовые, частично дифференцированные клетки. Важно отметить, что киназа NEK2 играет ключевую роль в регуляции сплайсинга пре-мРНК, так как может фосфорилировать множество сплайсосомных белков. Исходя из этих фактов, мы выбрали NEK2 как мишень для создания нового низкомолекулярного ингибитора.

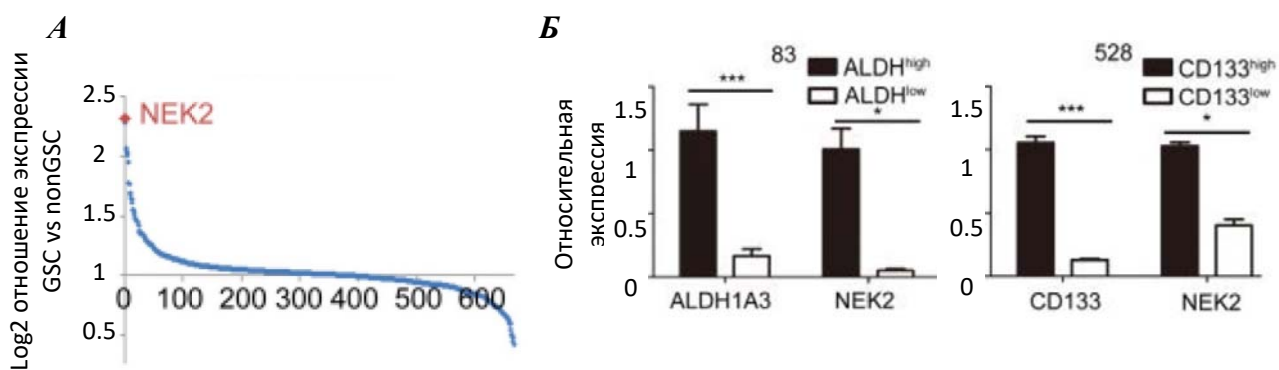


Рис. 26. *А - Относительная экспрессия генов, кодирующих киназы, в стволовых клетках глиобластомы и нормальных человеческих астроцитах. Б - Экспрессия NEK2, CD133 (маркёр пронеурональных стволовых клеток) и ALDH1A3 (маркёр мезенхимальных стволовых клеток) в мезенхимальных клетках глиобластомы, рассортированных по уровню окраски ALDEFLUOR (слева) и в пронеурональных клетках глиобластомы, рассортированных по уровню окраски на CD133 (справа).*

Скрининг библиотеки из 300 ингибиторов киназ позволил определить соединение (1) как потенциальный ингибитор NEK2 с $IC_{50} \approx 20 \mu M$ (**Рис. 27А**). Последующий компьютерный дизайн предсказал структуру (2) как более эффективный ингибитор. Соединение (2) было синтезировано и действительно показало улучшенную способность к ингибированию NEK2

($IC_{50} \approx 0.1 \mu M$). Последующая химическая модификация позволила создать соединение (3), обладающее $IC_{50} \approx 0.03 \mu M$. Соединение (3) представляло собой смесь энантиомеров. При разделении этой смеси были получены ингибиторы (3a) с $IC_{50} \approx 0.015 \mu M$ и (3b) с $IC_{50} \approx 0.2 \mu M$. Соединение (3a: 5-[7-{1-[2-(диметиламино)этил]-1H-пиразол-4-ил}имидазо[1,2-a]пиридин-3-ил]-3-((1R)-1-[2-(трифторметил)фенил]этокси}тиофен-2-карбоксамид) было названо СМР3а и использовано для дальнейших экспериментов (Рис. 27Б и 27В). Мы подтвердили селективность действия СМР3а, проверив его активность против 97ми киназ, принадлежащих к различным семействам. Данные на рисунке 27Г показывают, что СМР3а специфично ингибирует только NEK2, но не другие киназы.

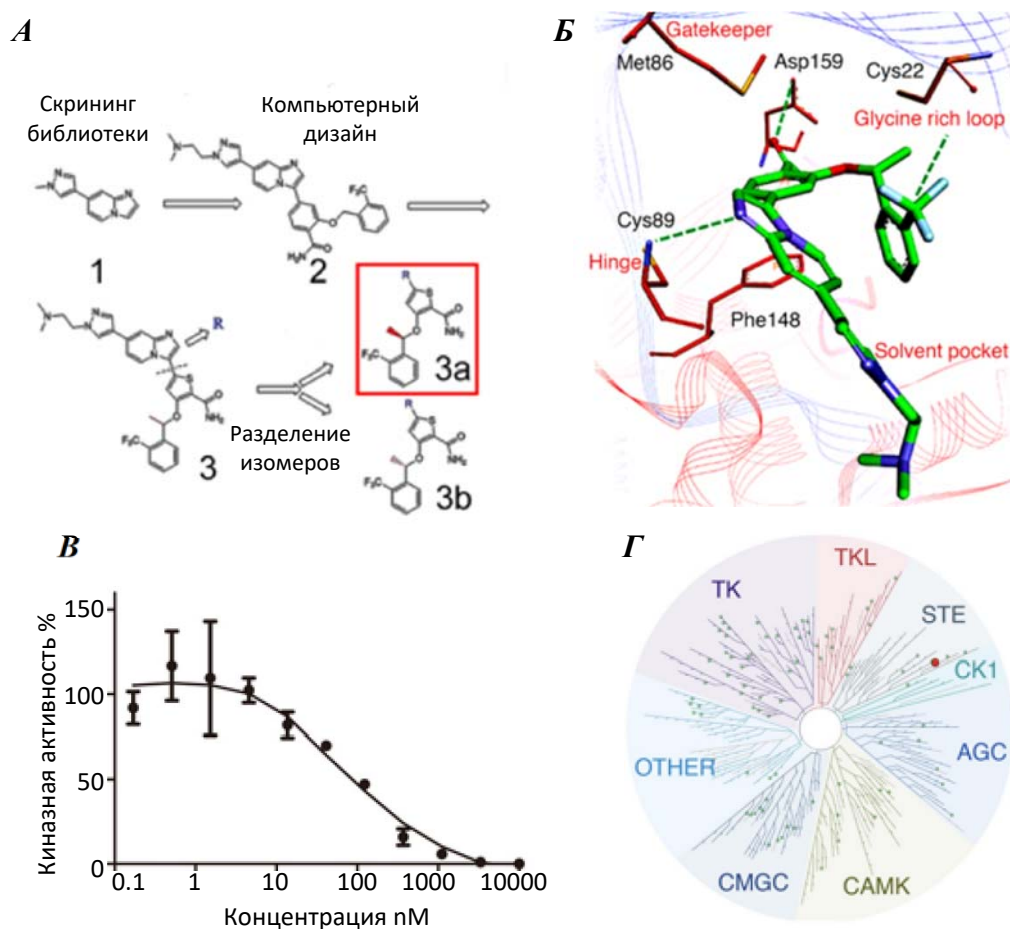


Рис. 27. А – Стратегия создания низкомолекулярного ингибитора киназы NEK2. Б - Рассчитанная структура ингибитора NEK2, взаимодействующего с активным центром этой киназы. В - Относительная киназная активность NEK2 при инкубации с различными концентрациями ингибитора. Г – Эффект низкомолекулярного ингибитора NEK2 на активность 97ми киназ. Размер точки пропорционален эффективности ингибирования.

Далее мы показали, что СМР3а способен в наномолярных концентрациях вызывать гибель культур, обогащённых стволовыми клетками глиобластомы, но не убивать более дифференцированные клетки (Рис. 28А). В заключении мы исследовали действие СМР3а *in vivo*. Как видно из рисунков 28Б и 28В введение раствора ингибитора NEK2 через хвостовую вену значительно увеличивает выживаемость животных и замедляет рост интракраниальных опухолей, трансплантированных иммунодефицитным мышам.

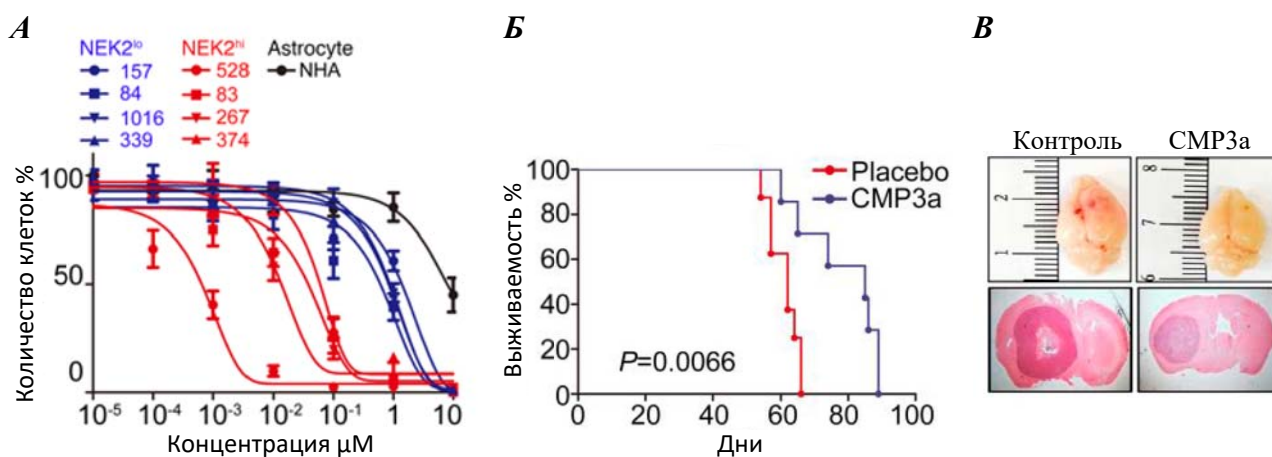


Рис. 28. *А* – Влияние ингибитора NEK2 на жизнеспособность нормальных человеческих астроцитов (NHA) и клеток глиобластомы, полученных от восьми различных пациентов. Клетки разделены на две группы: экспрессирующие NEK2 на высоком (красный) и низком (синий) уровнях. *Б* - Кривая Каплана-Мейера, демонстрирующая выживаемость мышей, в мозг которых были трансплантированы клетки глиобластомы человека, после чего мышам через хвостовую вену в течение 10 дней вводили ингибитор NEK2 (CMP3a) или растворитель. *В* - Окрашенные гематоксилином и эозином срезы мозга мышей, которым были трансплантированы клетки глиобластомы человека. Через 2 недели после трансплантации мышам через хвостовую вену в течение 10 дней вводили ингибитор NEK2 или растворитель.

3.2. Создание низкомолекулярного ингибитора белка Сурвивин.

В предыдущей главе мы показали, что мономер Сурвивина имеет крайне важные функции для опухолевых клеток. По этой причине мы решили изучить возможность ингибирования данного белка для лечения глиобластомы. Анализ экспрессии генов показал, что уровень Сурвивина повышен в стволовых клетках глиобластомы, но не в культурах человеческих астроцитов или предшественников нервных клеток (**Рис. 29А**). Далее мы сравнили экспрессию Сурвивина в опухолях головного мозга. Данные на **рисунках 29Б и 29В** показывают, что уровень этого белка существенно повышен в рецидивах глиобластомы. Такой результат был получен как на общей коллекции срезов опухолей мозга, так и на парных образцах опухолей от одних и тех же пациентов до и после терапии. Основываясь на этих данных, мы предположили, что ингибитор мономера Сурвивина должен эффективно действовать на популяцию более агрессивных стволовых клеток глиобластомы, появляющихся после терапии.

Ранее с помощью крупномасштабного ЯМР скрининга библиотеки химических веществ было обнаружено соединение, влияющее на положение аминокислот участка димеризации Сурвивина. Мы выбрали эту молекулу в качестве основы для компьютерного моделирования ингибиторов Сурвивина. На основании анализа полученных гипотетических структур, нами было синтезировано 11 веществ, которые по данным компьютерных предсказаний, должны связываться с высокой аффинностью с участком димеризации Сурвивина (**Рис. 30А**).

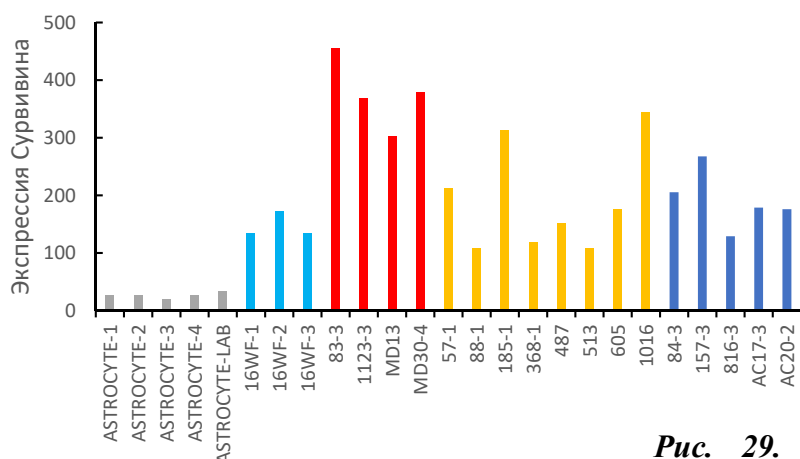
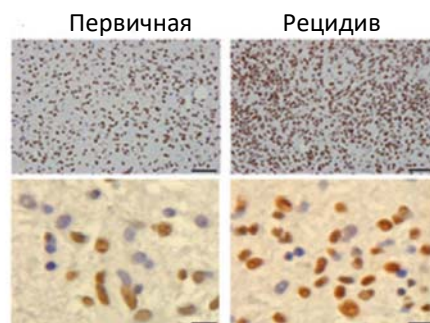
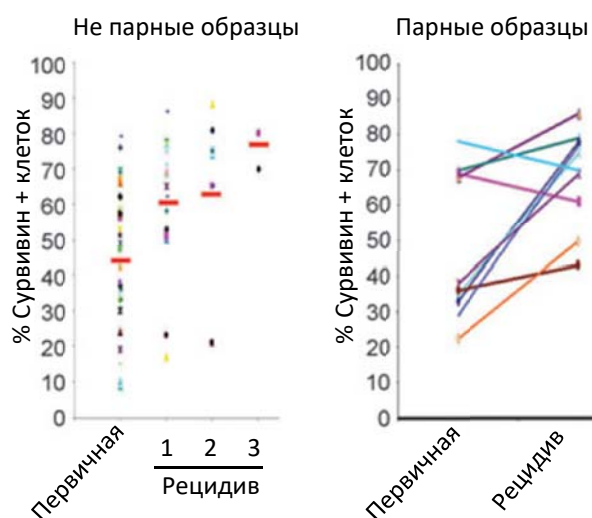
А**Б****В**

Рис. 29. *А* – Экспрессия Сурвивина в астроцитах (серый), предшественниках нервных клеток (голубой), мезенхимальных стволовых клетках глиобластомы (красный), пронеурональных стволовых клетках глиобластомы (синий) и не охарактеризованных клетках глиобластомы (жёлтый). *Б* – Иммуногистохимическое окрашивание срезов первичных и рецидивирующих глиобластом антителами на Сурвивин. *В* – Сравнения количества клеток, экспрессирующих Сурвивин, в первичной и рецидивирующей глиобластоме.

Способность полученных соединений ингибировать пролиферацию была проверена *in vitro* на культуре стволовых клеток глиомбластомы (**Рис. 30Б**). Результаты этого эксперимента показали, что вещество, названное «LLP-3» (4-[3,5-бис(бензилокси)фенил]-6-(5-хлоро-2-гидроксифенил)-2-оксо-1,2-дигидропиридин-3-карбонитрил), наиболее эффективно понижает жизнеспособность раковых клеток. Важно отметить, что по данным компьютерных расчётов, LLP-3 способен одновременно взаимодействовать с обоими мономерами, входящими в состав гомодимера Сурвивина. Другими словами, LLP-3 связывается с димером Сурвивина на участке контакта двух мономеров и, по-видимому, стабилизирует димерную форму существования Сурвивина (**Рис. 30В**). По приблизительным оценкам энергия димеризации Сурвивина составляет около 18 ккал/моль, в то время как энергия взаимодействия LLP-3 с димером Сурвивина примерно равна 12 ккал/моль. Таким образом, LLP-3 может вносить существенный вклад в стабилизацию димерной формы существования Сурвивина.

Чтобы подтвердить результаты компьютерного моделирования *in vitro*, мы исследовали взаимодействие LLP-3 с Сурвивином дикого типа, а также с мутантным белком Сурвивин^{F101A/L102A}, не способным образовывать димеров.

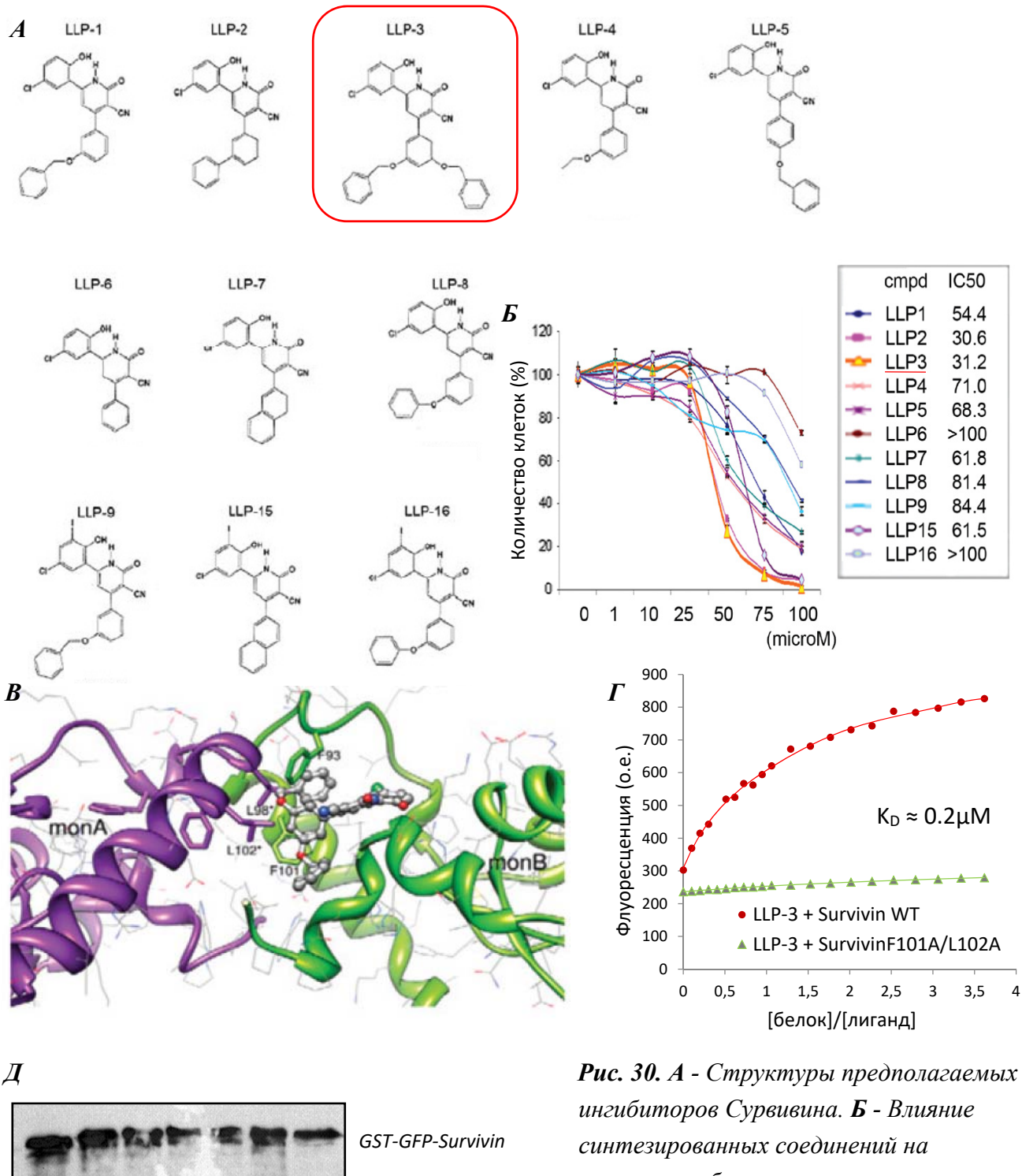


Рис. 30. А - Структуры предполагаемых ингибиторов Сурвивина. Б - Влияние синтезированных соединений на жизнеспособность стволовых клеток глиобластомы. В - Рассчитанная структура ингибитора Сурвивина, взаимодействующего с димерной формой этого белка. Г - Изменение интенсивности флуоресценции LLP-3 при титровании 1 μM раствора LLP-3 рекомбинантным Сурвивином или Сурвивином^{F101A/L102A}. Д - Иммунодетекции GST-GFP-Сурвивина связавшихся с иммобилизованными мономерами Сурвивина в присутствии различных концентраций LLP-3. Данный ингибитор был впервые описан в кандидатской диссертации Павлюкова М.С.

Ранее мы обнаружили, что LLP-3 обладает сильной флуоресценцией, интенсивность которой возрастает более чем в 4 раза после связывания с белками. Мы использовали это

свойство для исследования взаимодействия LLP-3 с Сурвивином (Рис. 30Г). Рассчитанная константа диссоциации LLP-3 от Сурвивина дикого типа составила около 0.2 μM , в то время как заметного связывания LLP-3 с Сурвивином^{F101A/L102A} обнаружено не было. Далее мы исследовали влияние LLP-3 на димеризацию рекомбинантного Сурвивина. Для этого мономеры Сурвивина дикого типа были иммобилизованы на пластике в присутствии мочевины и затем инкубированы с GFP-Сурвивином и различными концентрациями LLP-3. Связавшийся Сурвивин элюировался и детектировался методом иммуноблота. Результаты этого эксперимента (Рис. 30Д) подтверждают, что LLP-3 стабилизирует димеры Сурвивина.

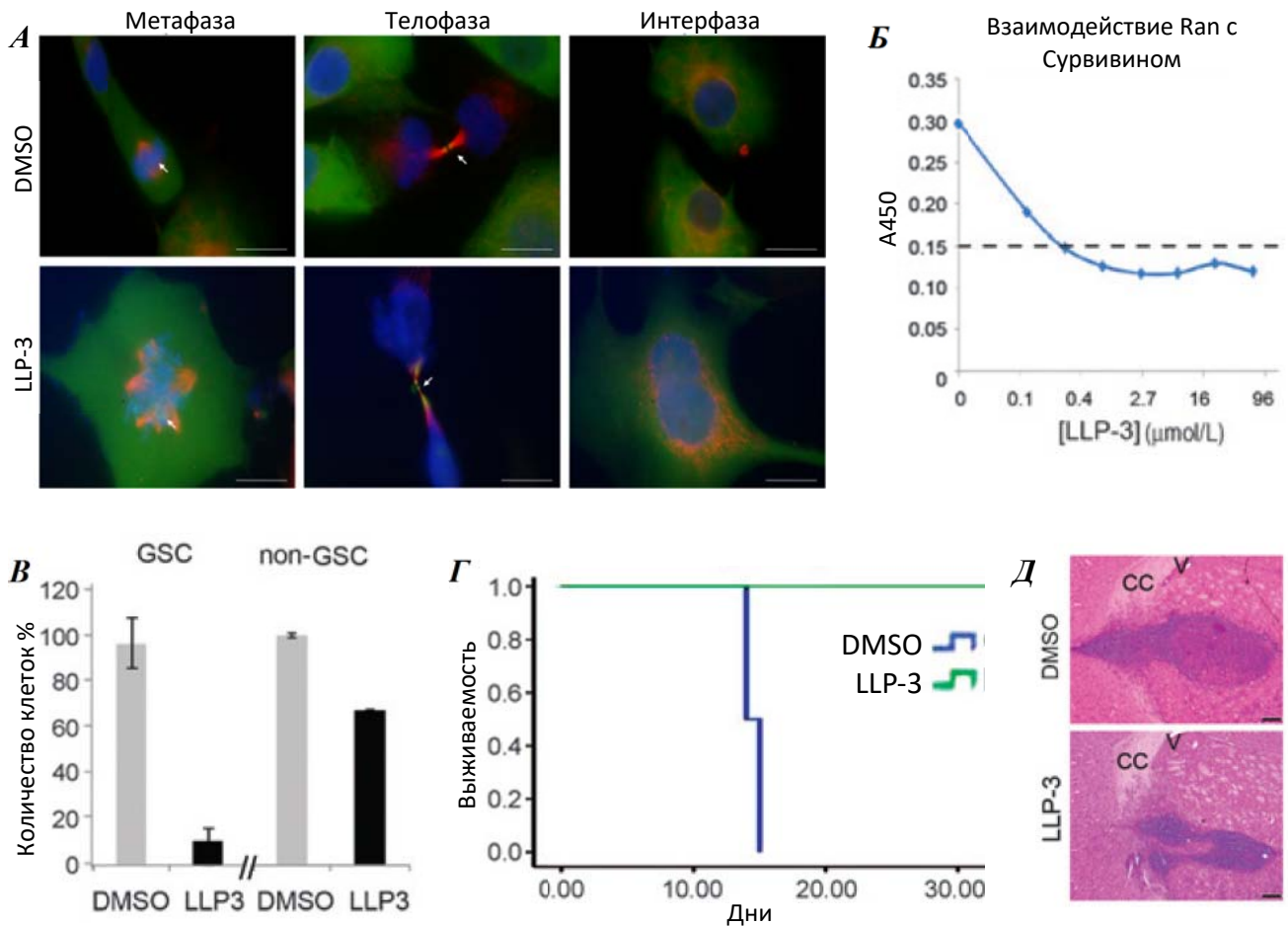


Рис. 31. *А* - Флуоресцентная микрофотография клеток, окрашенных антителами на ацетилированный α -тубулин (красный), Сурвивин (зелёный) и DAPI (синий). Клетки, обработанные 20 μM LLP-3 или DMSO (контроль), фотографировались на разных стадиях митоза и в интерфазе. *Б* - Количество GST-GFP-Ran связавшегося с иммобилизованным Сурвивином дикого типа или Сурвивином^{F101A/L102A} в присутствии различных концентраций LLP-3. Детекция проводилась методом твёрдофазного ИФА. *В* - Влияние LLP-3 на жизнеспособность стволовых и не стволовых клеток глиобластомы. *Г* - Кривая Каплана-Мейера, демонстрирующая выживаемость мышей, в мозг которых были трансплантированы клетки глиобластомы человека, после чего мышам внутрибрюшинно в течение 10 дней вводили LLP-3 или растворитель. *Д* - Окрашенные гематоксилином и эозином срезы мозга мышей, содержащие опухоли, сформированные также, как и в «Г».

Анализ молекулярного механизма действия LLP-3 на клетки глиобластомы показал, что это соединение вызывает многочисленные нарушения в процессе митоза (**Рис. 31А**), которые ранее были описаны при ингибировании взаимодействия Сурвивина с малой GTPазой Ran. Используя соответствующие рекомбинантные белки, мы подтвердили, что LLP-3 действительно способен ингибировать образование комплекса Сурвивин-Ran уже при концентрации 0,5 μM (**Рис. 31Б**). Следующим шагом мы продемонстрировали, что LLP-3 вызывает гибель стволовых клеток глиобластомы *in vitro*, но не частично дифференцированных опухолевых клеток (**Рис. 31В**). В заключении мы исследовали действие LLP-3 *in vivo*. Как видно из **рисунков 31Г** и **31Д** внутрибрюшинное введение раствора LLP-3 значительно увеличивает выживаемость животных и замедляет рост интракраниальных опухолей, трансплантированных иммунодефицитным мышам.

3.3. Создание низкомолекулярного ингибитора альдегид дегидрогеназы *ALDH1A3*.

Выше упоминалось, что, пожалуй, самой важной особенностью мезенхимальных клеток глиобластомы является изменённый тип метаболизма, который направлен на аэробный гликолиз, а не на окислительное фосфорилирование. Именно путь гликолиза при биоинформатическом анализе показывает наибольшие отличия при сравнении мезенхимальных клеток глиобластомы с любыми другими типами клеток этой опухоли. Более того, среди всех 25 000 генов наибольшее отличие по уровню экспрессии между мезенхимальными стволовыми клетками глиобластомы и другими клетками наблюдаются для одного из участников гликолитического пути, фермента *ALDH1A3*. В связи с этим, не удивительно, что в последние годы этот белок используется как главный и наиболее достоверный маркер мезенхимальных стволовых клеток глиобластомы.

Основываясь на этих данных, мы предположили, что ингибирование *ALDH1A3* может оказаться полезным для борьбы с наиболее агрессивной популяцией клеток глиобластомы - мезенхимальными стволовыми клетками. Скрининг природных соединений, проведённый ранее, выявил вещество даидзин как потенциальный ингибитор ферментов семейства *ALDH1*. Используя рациональный дизайн, мы смоделировали структуру и синтезировали молекулы сходные по строению с даидзином, однако предположительно обладающие улучшенными фармакокинетическими свойствами и возможностью проникать через гематоэнцефалический барьер. Среди синтезированных соединений два показывали способность ингибировать альдегид дегидрогеназную активность *in vitro* (**Рис. 32А** и **32Б**). Эти молекулы были названы GA11 и GA23. Мы сравнили эффект от этих соединений на пролиферации культур, обогащённых мезенхимальными стволовыми клетками, культур, обогащённых пронейрональными стволовыми клетками глиобластомы, а также линии нормальных человеческих астроцитов. Из **рисунка 32В** видно, что оба соединения наиболее эффективно действуют именно на мезенхимальные клетки, однако значение IC_{50} для ингибитора GA11 (2,6-дифенилимидазо[1,2-а]пиридин) оказалось ниже, поэтому он был выбран для экспериментов на модельных животных. Как видно из **рисунка 32Г**, внутрибрюшинное введение раствора GA11 статистически значимо увеличивает выживаемость животных, в мозг которым были трансплантированы человеческие клетки глиобластомы мезенхимального фенотипа.

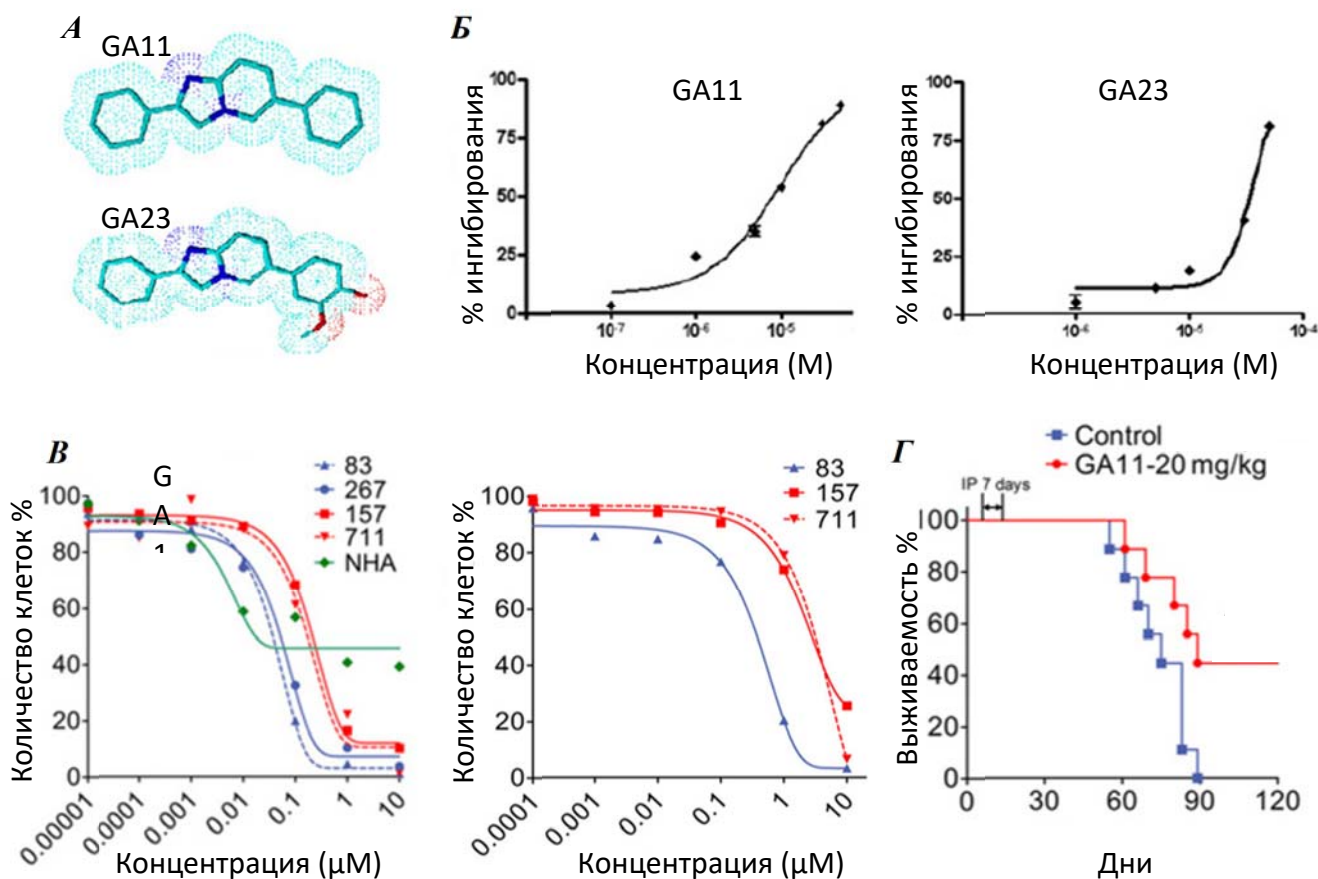


Рис. 32. А – Структуры предполагаемых ингибиторов ALDH1A3. Б - Относительная альдегид дегидрогеназная активность ALDH1A3 при инкубации с различными концентрациями GA11(слева) и GA23 (справа). В - Влияние GA11 (слева) и GA23 (справа) на жизнеспособность нормальных человеческих астроцитов (зелёный), мезенхимальных клеток глиобластомы (синий) и пронейрональных клеток глиобластомы (красный), полученных от различных пациентов. Г - Кривая Каплана-Мейера, демонстрирующая выживаемость мышей, в мозг которых были трансплантированы клетки глиобластомы человека, после чего мышам внутрибрюшинно в течение 7 дней вводили GA11 или растворитель.

4. Разработка метода для оценки концентрации и распределения низкомолекулярных соединений внутри клеток глиобластомы.

В предыдущей главе мы обсуждали возможность создания препаратов для уничтожения стволовых клеток глиобластомы, однако известно, что стволовые клетки зачастую обладают способностью активно удалять из себя вредные соединения. Таким образом, даже если нам удастся обнаружить молекулярную мишень, которая критически важна для существования стволовых клеток глиобластомы, создать соответствующий препарат, проникающий сквозь гематоэнцефалический барьер и накапливающийся в опухоли, всё равно будет высокий шанс того, что это соединение сможет уничтожить лишь дифференцированные раковые клетки, а небольшая популяция стволовых опухолевых клеток останется нетронутой из-за механизмов активного экспорта лекарств из цитоплазмы. В дополнении к этому, отдельной, однако не менее важной проблемой, является и

внутриклеточное распределение препарата. Так слишком гидрофильные молекулы могут плохо проходить сквозь плазматическую мембрану, а слишком гидрофобные наоборот будут накапливаться в липидном бислое и не доходить до своей внутриклеточной мишени. Таким образом, для успешной разработки новых методов противоопухолевой терапии необходимо иметь возможность оценивать распределение препарата как в пределах ткани, так и внутри единичных клеток. Для решения этой проблемы мы использовали метод TOF-SIMS масс-спектрометрии.

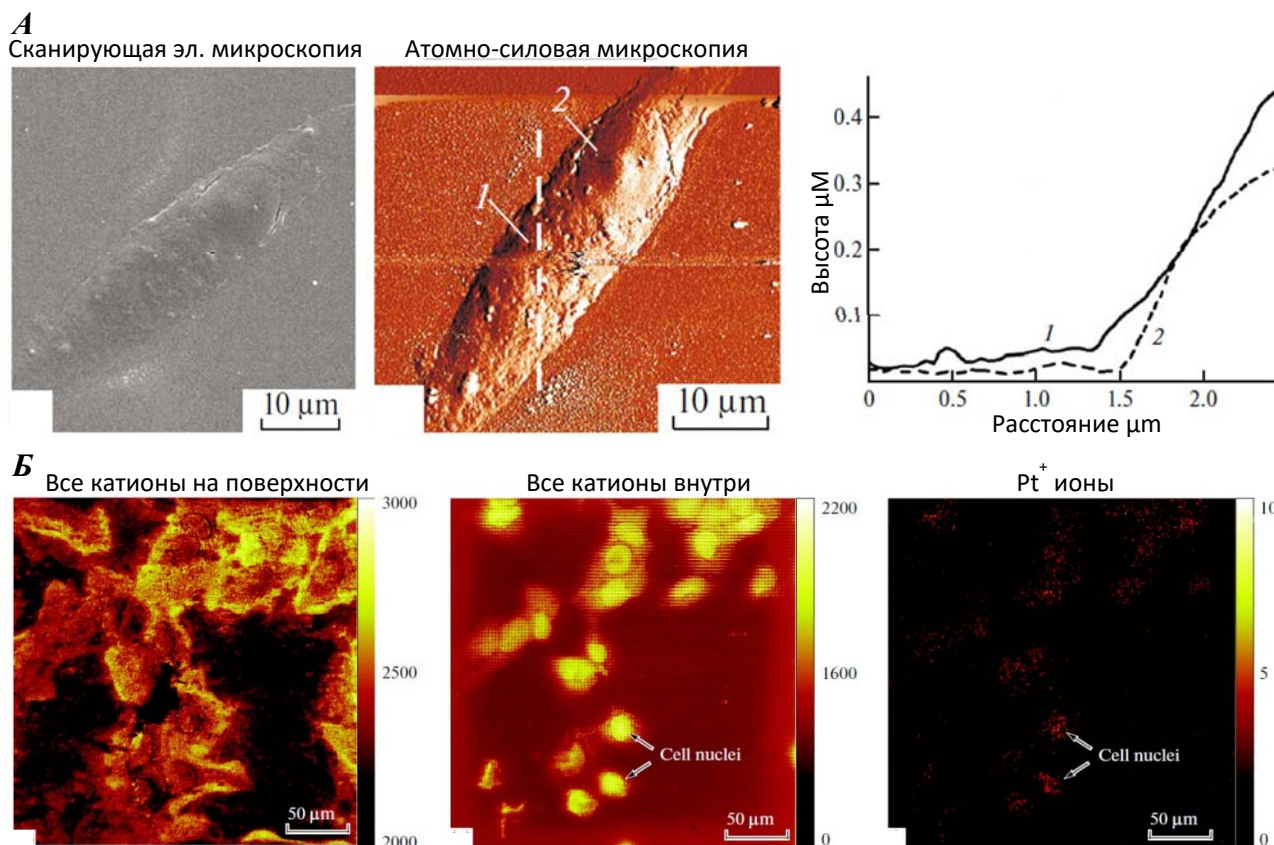


Рис. 33. *А* – Удаление наружной плазматической мембраны с помощью бомбардировки клеток ионами Cs^+ . Клетки глиобластомы выращивали на кремниевой подложке, после чего фиксировали, высушивали и часть клетки бомбардировали ионами Cs^+ . После бомбардировки изображение клетки получали с помощью сканирующего электронного микроскопа (слева) и атомно-силового микроскопа (в центре). На графике справа приведён профиль поверхности участка клетки, не бомбардированного (1) и бомбардированного (2) ионами Cs^+ . **Б** – Клетки глиобластомы выращивали на кремниевой подложке, обрабатывали цисплатином, после чего фиксировали, высушивали и анализировали с помощью TOF-SIMS масс-спектрометра. Слева приведено изображение, иллюстрирующее выход всех вторичных катионов до срезания мембраны, в центре – выход всех вторичных катионов после срезания мембраны, и справа – выход ионов Pt^+ после срезания плазматической мембраны.

TOF-SIMS (Time of flight secondary ion mass spectrometry; масс-спектрометрия вторичных ионов) в основном используется для анализа наноматериалов, а также исследований вземных объектов в космосе. Принцип метода заключается в ионизации поверхности твёрдого образца пучком первичных ионов с различной энергией и последующей

детекции вторичных ионов на времяпролётном масс-спектрометре. Уникальной особенностью TOF-SIMS является возможность сканирования как крупных, так и мелких объектов размерами от нескольких микрометров до сантиметра с пространственным разрешением до 200 нм по ширине и до 10 нм по глубине. Диапазон детектируемых m/z простирается от 1 до 1000. Несмотря на такие замечательные характеристики, TOF-SIMS почти не используется для анализа биологических объектов, так как при стандартных настройках энергия первичных ионов слишком велика для мягкой ионизации сложных органических соединений.

После длительной оптимизации условий, используя первичные ионы Bi_3^+ , нам удалось найти режим ионизации, позволяющий детектировать несколько сотен различных низкомолекулярных соединений внутри клетки, таких как липиды, аминокислоты и некоторые продукты метаболизма углеводов. Более того, используя высокоэнергичные ионы Cs^+ , мы разработали методику послойного удаления частей клетки. Так на **рисунке 33А** показана клетка, с верхней половины которой была удалена наружная мембрана. На изображениях, полученных с помощью электронного и атомно-силового микроскопов, чётко видна поверхность ядра, обнажившаяся после удаления плазматической мембраны. Используя поочерёдные бомбардировки клеток ионами Bi_3^+ и Cs^+ , мы проанализировали поверхность и внутреннее содержимое клеток глиобластомы, обработанных цисплатином. В этом эксперименте мы смогли детектировать накопление ионов платины в ядрах клеток (**Рис. 33Б**), что свидетельствует о потенциальной возможности TOF-SIMS детектировать распределение некоторых противоопухолевых препаратов внутри клеток глиобластомы.

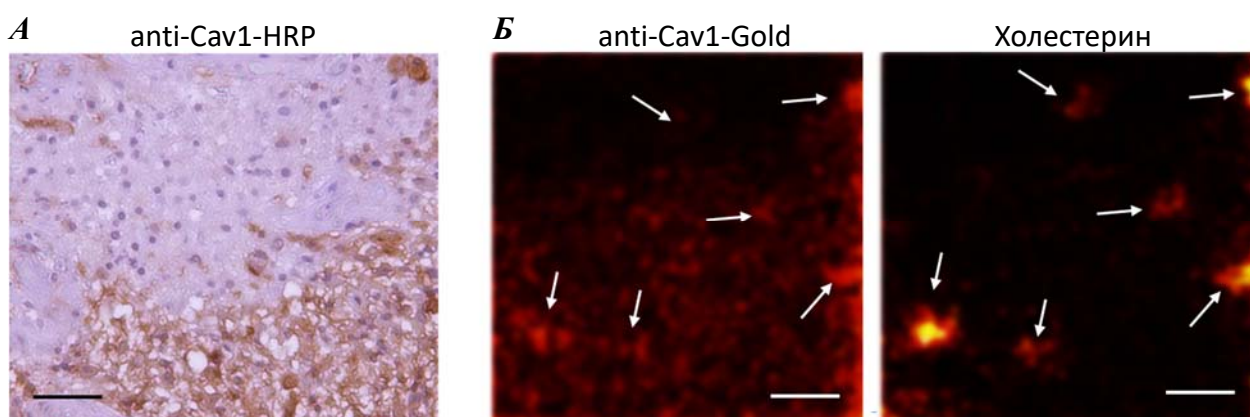


Рис. 34. *А* – Окрашивание среза глиобластомы человека первичными антителами к Кавеолину-1 и вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена. *Б* – Анализ среза глиобластомы человека с помощью TOF-SIMS масс-спектрометрии. Срез опухоли был окрашен антителами к Кавеолину-1, конъюгированными с золотыми наночастицами. Изображения иллюстрируют выход вторичных ионов золота (слева) и вторичных ионов холестерина (справа).

К сожалению, метод TOF-SIMS не позволяет детектировать белки. Чтобы преодолеть это ограничение мы решили использовать антитела меченные золотыми наночастицами. В качестве мишени для первого эксперимента мы выбрали белок Кавеолин-1, количество которого коррелирует с содержанием холестерина в клеточной мембране, а высокое содержание холестерина, в свою очередь, характерно для стволовых клеток глиобластомы. На

рисунке 34А приведена стандартная окраска среза глиобластомы человека первичными антителами на Кавеолин-1 и вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена. На **рисунке 34Б** показано изображение, полученное при TOF-SIMS анализе другого среза глиобластомы, окрашенного антителами на Кавеолин-1, конъюгированными с золотыми нано частицами. На этом срезе мы одновременно детектировали ионы золота (слева) и холестерин (справа). Из **рисунка 34** видно, что окрашивание антителами на Кавеолин-1 выглядит сходным образом в независимости от метода детекции (активность пероксидазы или ионизация золота), кроме того мы наблюдали частичную колокализацию Кавеолина-1 с Холестерином, что совпадает с литературными данными. Таким образом в этом эксперименте мы впервые смогли осуществить детекцию белка и холестерина на одном и том же срезе человеческой опухоли, а кроме того мы наблюдали единичные клетки или группы клеток богатые холестерином, которые могут представлять собой стволовые клетки глиобластомы. Мы надеемся, что дальнейшая оптимизация этой методики позволит нам сравнивать эффективность накопления разнообразных противоопухолевых препаратов в различных типах клеток глиобластомы, присутствующих в одной и той же опухоли.

Заключение.

В данной работе мы попытались, во-первых, провести всестороннее исследование процесса апоптоза, и, во-вторых, совместить фундаментально научную тематику с более прикладными исследованиями медицинской направленности.

В первой части работы мы получили интересные новые данные о механизмах функционирования индивидуальных белков-регуляторов апоптоза. Так для белка AIF мы впервые предложили модель связывания и диссоциации от наружной митохондриальной мембраны. Для белка Параоксоназа 2 мы впервые попытались объяснить причину, по которой в одних опухолях этот белок выполняет онкогенные, а в других онкосупрессорные функции. Для белка Трансглутаминазы 2 мы, во-первых, впервые разработали систему детекции изменений его конформации внутри живой клетки, а, во-вторых, разрешили многолетний спор о способности этого белка активироваться внутри клетки при индукции апоптоза. Наконец, наиболее интересные данные были получены нами для белка Сурвивин. Мы исследовали роль мономера этого белка и впервые предположили совершенно новый механизм переключения между различными функциями Сурвивина в клетке, основанный на смещении равновесия мономер-димер.

Во второй части работы мы впервые продемонстрировали, что сплайсосомные белки могут быть экспортированы из клеток. Основываясь на многочисленных экспериментах, мы предположили принципиально новый механизм межклеточной коммуникации, осуществляемый с помощью транспорта сплайсосомных белков, заключенных в везикулы. Данные подтверждающие нашу гипотезу были получены на двух совершенно разных типах рака и поэтому мы надеемся, что такой механизм, как минимум, является общим для всех или почти всех типов опухолей, а возможно также существует и в нормальных тканях человеческого организма. Развивая эту гипотезу, мы предположили модель эволюции опухолей головного мозга, основанную на том, что апоптотические клетки, обильно

возникающие на поздних этапах развития опухоли, а также после терапии, могут способствовать мезенхимальной трансформации соседних выживших клеток, что в итоге придаёт глиобластоме более агрессивные свойства. Кроме того, в этой части работы мы впервые исследовали функции белка RBM11, которые ранее оставались загадкой.

В третьей части работы мы создали и протестировали на модельных животных три новых противоопухолевых препарата, вызывающих гибель наиболее агрессивных стволовых и мезенхимальных клеток глиобластомы. Среди этих ингибиторов хочется отметить СМР3а, который эффективно убивал клетки глиобластомы в концентрации 10-100 нМ. Для сравнения, чтобы добиться такого же эффекта с темозоламидом, стандартным препаратом для лечения глиобластомы, необходима концентрация 100-200 мМ, что на 3 порядка выше, чем для СМР3а. С другой стороны, хочется отметить созданный нами ингибитор LLP-3, который хотя и менее эффективен, однако с биохимической точки зрения обладает интереснейшим механизмом действия, основанным на стабилизации димерной формы Сурвивина.

Наконец, в последней, четвертой, части работы мы продемонстрировали уникальные возможности TOF-SIMS масс-спектрометрии для анализа отдельных клеток и опухолевой ткани. Хотя оптимизация этой методики в настоящий момент находится в самом начале, нами уже были получены интересные результаты по одновременной детекции белка и молекул липидной природы в опухолевой ткани. Насколько нам известно подобные данные никогда не публиковались ранее.

ВЫВОДЫ

1. Исследованы молекулярные механизмы антиапоптотического действия белков Морталин, Сурвивин, Параоксоназа 2 и Трансглутаминаза 2.
2. Разработан метод для детекции изменений конформации белка Трансглутаминаза 2 в режиме реального времени в единичных живых опухолевых клетках.
3. Показано, что при индукции апоптоза клетки глиобластомы и рака яичника секретируют РНК и белковые компоненты сплайсосом, заключённые внутри везикул.
4. Предположен новый механизм межклеточной коммуникации, основанный на транспорте сплайсосомных белков между клетками.
5. Предположен новый механизм мезенхимальной трансформации клеток глиобластомы, индуцируемый апоптотическими клетками.
6. Исследованы функции белка RBM11 в опухолевых клетках.
7. Создано три новых противоопухолевых препарата, убивающих популяцию стволовых и мезенхимальных клеток глиобластомы: (1) LLP3: ингибитор белка Сурвивин, связывающийся с Сурвивином с $K_d = 0.2 \mu\text{M}$ и убивающий клетки глиобластомы с $IC_{50} = 30 \mu\text{M}$; (2) СМР3а: ингибитор киназы NEK2, ингибирующий активность NEK2 с $IC_{50} = 0,015 \mu\text{M}$ и убивающий клетки глиобластомы с $IC_{50} = 0,01-0,05 \mu\text{M}$; (3) GA11: ингибитор альдегид дегидрогеназы ALDH1A3, ингибирующий активность ALDH1A3 с $IC_{50} = 10 \mu\text{M}$ и убивающий клетки глиобластомы с $IC_{50} = 0,2-0,5 \mu\text{M}$.
8. Разработан метод анализа клеток и срезов опухолей головного мозга с помощью TOF-SIMS масс-спектрометрии.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Marat S. Pavlyukov**, Nadezhda V. Antipova, Maria V. Balashova, Tatjana V. Vinogradova, Evgenij P. Kopantzev, Mihail I. Shakhparonov. Survivin Monomer Plays an Essential Role in Apoptosis Regulation. *J Biol Chem*. 2011, 286(26): 23296-23307.
2. **Pavlyukov MS**, Antipova NV, Balashova MV, Shakhparonov MI. Detection of Transglutaminase 2 conformational changes in living cell. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012, 421(4): 773-779.
3. L.L. Zavalova, N.V. Antipova, Yu.I. Fadeeva, **M.S. Pavlyukov**, N.V. Pletneva, V.Z. Pletnev, I.P. Baskova. Catalytic Sites of Medicinal Leech Enzyme Destabilase–Lysozyme (mDL): Structure–Function Relationship. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2012, 38(2): 198–202.
4. Guvenc H.*, **Pavlyukov M.S.***, Kurt H., Banasavadi-Siddegowda Y.K., Mao P., Hong C., Yamada R., Kwon C.H., Bhasin D., Chettiar S., Kitange G., Park I.H., Sarkaria J.N., Li C., Shakhparonov M.I., Nakano I. Impairment of glioma stem cell survival and growth by a novel inhibitor for Survivin/Ran protein complex. *Clin Cancer Res*. 2013, 19(3): 631–642. ***Равный вклад**
5. Victoria O. Shender*, **Marat S. Pavlyukov***, Rustam H. Ziganshin, Georgij P. Arapidi, Kovalchuk S.I., Anikanov N.A., Altukhov I.A., Alexeev D.G., Butenko I.O., Shavarda A.L., Khomyakova E.B., Evtushenko E., Ashrafyan L.A., Antonova I.B., Kuznetsov I.N., Gorbachev A. Y., Shakhparonov M.I., Govorun V.M. Proteome-metabolome profiling of ovarian cancer ascites reveals novel components involved in intercellular communication. *Mol Cell Proteomics*. 2014, 13(12): 3558-3571. ***Равный вклад**
6. Brun S.N., Markant S.L., Esparza L.A., Garcia G., Terry D., Huang J.M., **Pavlyukov M.S.**, Li X.N., Grant G.A., Crawford J.R., Levy M.L., Conway E.M., Smith L.H., Nakano I., Berezov A., Greene M.I., Wang Q., Wechsler-Reya R.J. Survivin as a therapeutic target in Sonic hedgehog-driven medulloblastoma. *Oncogene*. 2015, 34(29): 3770-3779.
7. A. A. Gulin, **M. S. Pavlyukov**, S. K. Gularyan, V. A. Nadtochenko. Visualization of the spatial distribution of Pt⁺ ions in cisplatin-treated glioblastoma cells by time-of-flight secondary ion mass spectrometry. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series A: Membrane and Cell Biology*. 2015, 9(3): 202-209.
8. Peng Cheng, Jia Wang, Indrayani Waghmare, Stefania Sartini, Vito Coviello, Sung-Hak Kim, Ahmed Mohyeldin, **Marat S. Pavlyukov**, Mutsuko Minata, Valentim C.L., Chhipa R.R., Bhat K.P., Dasgupta B., La Motta C., Kango-Singh M., Nakano I. FOXD1-ALDH1A3 signaling is a determinant for the self-renewal and tumorigenicity of mesenchymal glioma stem cells. *Cancer Res*. 2016, 76(24):7219-7230.
9. A. A. Gulin, **M. S. Pavlyukov**, S. A. Gusev, Yu. N. Malakhova, A.I. Buzin, S.N. Chvalun, K.G. Aldarov, D.V. Klinov, S.K. Gularyan, V.A. Nadtochenko. Applicability of TOF-SIMS for the Assessment of Lipid Composition of Cell Membrane Structures. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series A: Membrane and Cell Biology*. 2017, 11(2): 144-150.
10. Jia Wang, Peng Cheng, **Marat S Pavliukov**, Yu H., Zhang Z., Kim S.H., Minata M., Mohyeldin A., Xie W., Chen D., Goidts V., Frett B., Hu W., Li H., Shin Y.J., Lee Y., Nam D.H., Kornblum H.I., Wang M., Nakano I. Targeting NEK2 attenuates glioblastoma growth and radio-resistance via de-stabilizing EZH2. *J Clin Invest*. 2017, 127(8): 3075-3089.

11. **Marat S. Pavlyukov**, Hai Yu, Bastola S., Minata M., Shender V.O., Lee Y., Zhang S., Wang J., Komarova S., Wang J., Yamaguchi S., Alsheikh H.A., Shi J., Chen D., Mohyeldin A., Kim S.H., Shin Y.J., Anufrieva K., Evtushenko E.G., Antipova N.V., Arapidi G.P., Govorun V., Pestov N.B., Shakhparonov M.I., Lee L.J., Nam D.H., Nakano I. Apoptotic cell-derived extracellular vesicles promote malignancy of glioblastoma via intercellular transfer of splicing factors. *Cancer Cell*. 2018, 34(1): 119-135.
12. Antipova N.V., Levakova S.A., Sheshukova N.A., Obukhova E.A., **Pavlyukov M.S.**, Shakhparonov M.I. Placental expression level of the PON1, PON2, and PON3 genes in patients with uncomplicated pregnancy and preeclampsia. *Akush Ginekol (Mosk)*. 2018, 7: 40-44.
13. Ksenia S. Anufrieva, Victoria O. Shender, Georgij P. Arapidi, **Marat S. Pavlyukov**, Shakhparonov M.I., Shnaider P.V., Butenko I.O., Lagarkova M.A., Govorun V.M. Therapy-induced stress response is associated with downregulation of pre-mRNA splicing in cancer cells. *Genome Med*. 2018, 10(1): 49.
14. Shender V.O., Arapidi G.P., **Pavlyukov M.S.**, Shnaider P.V., Anufrieva K.S., Stepanov G.A., Govorun V.M. The Role of Intercellular Communication in Cancer Progression. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. 2018, 44(5): 471-480.
15. Fujishiro T., Nonoguchi N., **Pavliukov M.**, Ohmura N., Kawabata S., Park Y., Kajimoto Y., Ishikawa T., Nakano I., Kuroiwa T. 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy can target human glioma stem-like cells refractory to antineoplastic agents. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2018, 24: 58-68.
16. M. I. Shakhparonov, N. V. Antipova, V. O. Shender, P. V. Shnaider, G. P. Arapidi, N. B. Pestov, **M. S. Pavlyukov**. Expression and Intracellular localization of Paraoxonase 2 in different types of Malignancies. *Acta Naturae*. 2018, 10(3): 92-99.
17. N. P. Fadeeva, N. V. Antipova, V. O. Shender, K. S. Anufrieva, G. A. Stepanov, S. Bastola, M. I. Shakhparonov, **M. S. Pavlyukov**. Identification of Novel Interaction Partners of AIF Protein on Outer Mitochondrial Membrane. *Acta Naturae*. 2018, 10(4): 58-67.
18. Stepanov G., Zhuravlev E., Shender V., Nushtaeva A., Balakhonova E., Mozhaeva E., Kasakin M., Koval V., Lomzov A., **Pavlyukov M.**, Malyants I., Zhorov M., Kabilova T., Chernolovskaya E., Govorun V., Kuligina E., Semenov D., Richter V. Nucleotide Modifications Decrease Innate Immune Response Induced by Synthetic Analogs of snRNAs and snoRNAs. *Genes (Basel)*. 2018, 9(11): E531.
19. **M. S. Pavlyukov**, A. A. Gulin, A. A. Astafiev, V. Yu. Svetlichny, S. K. Gularyan. Lateral Heterogeneity of Cholesterol Distribution in Cell Plasma Membrane: Investigation by Microfluorimetry, Immunofluorescence, and TOF-SIMS. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series A: Membrane and Cell Biology*. 2019, 13(1): 50-57.
20. Mutsuko Minata, Alessandra Audia, Junfeng Shi, Songjian Lu, Joshua Bernstock, **Marat S. Pavlyukov**, Das A., Kim S.H., Shin Y.J., Lee Y., Koo H., Snigdha K., Waghmare I., Guo X., Mohyeldin A., Gallego-Perez D., Wang J., Chen D., Cheng P., Mukheef F., Contreras M., Reyes J.F., Vaillant B., Sulman E.P., Cheng S.Y., Markert J.M., Tannous B.A., Lu X., Kango-Singh M., Lee L.J., Nam D.H., Nakano I., Bhat K.P. Phenotypic Plasticity of Invasive Edge Glioma Stem-like Cells in Response to Ionizing Radiation. *Cell Rep*. 2019, 26: 1893-1905.