

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

На правах рукописи

Ларионова Татьяна Дмитриевна

**СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ИЗОФОРМ РИБОСОМАЛЬНОГО БЕЛКА
RPL22L1 В РЕГУЛЯЦИИ ФЕНОТИПА КЛЕТОК ГЛИОБЛАСТОМЫ**

Специальность 1.5.3 – «Молекулярная биология»

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
д.х.н., г.н.с.
Шахпаронов Михаил Иванович

Научный консультант:
д.б.н., в.н.с.
Павлюков Марат Самвелович

Москва – 2022

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	6
ВВЕДЕНИЕ	9
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	11
1.1 Глиобластома	11
1.1.1. Молекулярная гетерогенность глиобластом	11
1.1.2. Стволовые клетки глиобластомы.....	13
1.1.3. Морфологические особенности глиобластом.....	16
1.1.4. Ацидоз в глиобластоме.....	18
1.1.5. Последствия ацидоза при глиобластоме.....	21
1.2. Альтернативный сплайсинг в опухолях.....	22
1.2.1. Механизм сплайсинга.....	22
1.2.2. Изменение сплайсинга в опухолях.....	26
1.2.3. Механизмы регуляции сплайсинга	27
1.2.3.1. Структура SR-белков	28
1.2.3.2. Функции SR-белков в альтернативном сплайсинге.....	29
1.2.3.3. Регуляция активности SR-белков.....	30
1.2.3.4. SR-белки в опухолях	32
1.3. Рибосомы как важный источник разнообразия протеома.....	33
1.3.1. Гетерогенность рибосом	33
1.3.2. Рибосомный белок RPL22L1	39
Заключение.....	41
2. ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ РАБОТЫ.....	42
3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	43
3.1. Материалы	43
3.1.1. Важнейшее оборудование.....	43
3.1.2. Расходные материалы	43
3.1.3. Основные реактивы и компьютерные программы.....	44
3.1.4. Олигодезоксирибонуклеотиды	48
3.1.5. Буферные растворы.....	48
3.1.6. Микробиологические среды	49
3.1.7. Среда для культивирования эукариотических клеток	49
3.2. Методы.....	50
3.2.1. Методы работы с ДНК.....	50
3.2.1.1. Рестрикция ДНК.....	50
3.2.1.2. Дефосфорилирование концов ДНК.....	50

3.2.1.3.	<i>Лигирование ДНК</i>	50
3.2.1.4.	<i>Выделение плазмидной ДНК из бактерий</i>	50
3.2.1.5.	<i>Аmplификация фрагментов ДНК методом полимеразной цепной реакции</i>	50
3.2.1.6.	<i>Очистка ПЦР-продукта</i>	52
3.2.1.7.	<i>Электрофорез ДНК</i>	52
3.2.1.8.	<i>Выделение ДНК из геля</i>	52
3.2.1.9.	<i>Секвенирование плазмидной ДНК</i>	52
3.2.1.10.	<i>Создание плазмидных векторов</i>	52
3.2.2.	<i>Методы работы с РНК</i>	53
3.2.2.1.	<i>Выделение РНК и получение кДНК</i>	53
3.2.2.2.	<i>РНК-иммунопреципитация (RIP)</i>	53
3.2.2.3.	<i>Секвенирование РНК</i>	54
3.2.2.4.	<i>Анализ стабильности РНК</i>	54
3.2.2.5.	<i>Определение концентрации нуклеиновых кислот</i>	54
3.2.3.	<i>Методы работы с бактериями</i>	54
3.2.3.1.	<i>Приготовление химически компетентных клеток E.coli</i>	54
3.2.3.2.	<i>Химическая трансформация клеток E.coli</i>	55
3.2.3.3.	<i>ПЦР скрининг колоний, выросших на агаризованной среде</i>	55
3.2.3.4.	<i>Индукция синтеза рекомбинантных белков в бактериях E.coli</i>	55
3.2.3.5.	<i>Консервация штаммов E.coli</i>	56
3.2.4.	<i>Методы работы с белками</i>	56
3.2.4.1.	<i>Выделение белков, содержащих гексагистидиновый участок, в денатурирующих условиях из бактерий E.coli</i>	56
3.2.4.2.	<i>Денатурирующий электрофорез в ПААГ по Лэмбли</i>	56
3.2.4.3.	<i>Иммуноблотинг</i>	57
3.2.4.4.	<i>Проявление мембраны после иммуноблотинга</i>	57
3.2.4.5.	<i>Исследование взаимодействия рекомбинантных белков in vitro методом «пул-дауна» с помощью Protein-A/G магнитных частиц</i>	57
3.2.4.6.	<i>Исследование белок-белковых взаимодействий in vitro методом преципитации белков из клеточных лизатов с помощью Ni-NTA магнитных частиц</i>	58
3.2.4.7.	<i>SILAC</i>	58
3.2.4.8.	<i>Подготовка образцов для фосфопротеомного анализа</i>	59
3.2.4.9.	<i>LC-MS/MS анализ</i>	59
3.2.5.	<i>Методы работы с эукариотическими клетками</i>	60
3.2.5.1.	<i>Культивирование клеток</i>	60
3.2.5.2.	<i>Создание первичных клеточных линий глиобластомы</i>	60
3.2.5.3.	<i>STR анализ первичных клеточных линий</i>	61

3.2.5.4.	<i>Трансфекция клеток плазмидной ДНК.</i>	61
3.2.5.5.	<i>Получение лентивирусных частиц.</i>	62
3.2.5.6.	<i>Трансдукция клеток лентивирусными частицами.</i>	62
3.2.5.7.	<i>Селекция клеток, инфицированных лентивирусными частицами.</i>	63
3.2.5.8.	<i>Иммуноцитофлуоресцентная микроскопия.</i>	63
3.2.5.9.	<i>Определение подвижности клеток методом “зарадания царапины”.</i>	63
3.2.5.10.	<i>Анализ жизнеспособности клеток.</i>	63
3.2.5.11.	<i>Анализ пролиферации клеток.</i>	64
3.2.5.12.	<i>Проточная цитофлуориметрия.</i>	64
3.2.5.13.	<i>Сортировка клеток.</i>	64
3.2.5.14.	<i>Анализ частоты формирования нейросфер.</i>	64
3.2.5.15.	<i>Анализ уровня трансляции.</i>	65
3.2.5.16.	<i>Выделение рибосом.</i>	65
3.2.5.17.	<i>Фракционирование полисом.</i>	65
3.2.6.	<i>Методы работы с тканями.</i>	66
3.2.6.1.	<i>Имуногистохимия.</i>	66
3.2.6.2.	<i>Имуногистофлуоресценция.</i>	66
3.2.7.	<i>Методы работы с животными.</i>	67
3.2.7.1.	<i>Имплантация человеческой глиобластомы в мозг иммунодефицитным мышам.</i>	67
3.2.7.2.	<i>Введение мышам препаратов</i>	67
3.2.8.	<i>Биоинформатический анализ</i>	68
3.2.8.1.	<i>Анализ результатов LC-MS/MS.</i>	68
3.2.8.2.	<i>Анализ экспрессии генов и альтернативного сплайсинга.</i>	68
3.2.8.3.	<i>Анализ данных RIP seq и Ribo seq.</i>	69
3.2.8.4.	<i>GSEA-анализ.</i>	70
3.2.8.5.	<i>Филогенетический анализ.</i>	70
3.2.8.6.	<i>Статистический анализ.</i>	70
4.	<i>Результаты и обсуждение.</i>	71
4.1.	<i>Изучение белкового состава рибосом у разных популяций клеток GBM.</i>	71
4.2.	<i>Исследование альтернативного сплайсинга пре-мРНК RPL22L1.</i>	73
4.3.	<i>Изучение функций изоформ RPL22L1 в клетках GBM.</i>	79
4.3.1.	<i>Изучение факторов, приводящих к образованию изоформы RPL22L1b в клетках GBM.</i>	79
4.3.2.	<i>Определение функций изоформ RPL22L1.</i>	83
4.3.3.	<i>Изучение интерактома изоформ RPL22L1 в клетках GBM.</i>	86
4.3.4.	<i>Изучение роли RPL22L1b в регуляции сплайсинга пре-мРНК в клетках GBM.</i>	89

4.3.5. Изучение роли RPL22L1a в регуляции трансляции в клетках GBM.	93
4.4. Изучение механизмов регуляции сплайсинга пре-мРНК RPL22L1.	96
4.5. Исследование действия нового низкомолекулярного ингибитора Слк-киназ на сплайсинг пре-мРНК RPL22L1.	101
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.	108
ВЫВОДЫ.	110
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ:	111
ПРИЛОЖЕНИЯ.	125

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АТФ – аденозинтрифосфат

ГЭБ – гематоэнцефалический барьер

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ед. – единицы

днРНК – длинная некодирующая РНК

кДа – килодальтон

кДНК – комплементарная ДНК

Крио-ЭМ – криоэлектронная микроскопия

л – литр

мин – минута

мкм – микрометр

мкл – микролитр

мл – миллилитр

мМ – миллимоль на литр

МРТ – магнитно-резонансная томография

мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота

нМ – наномоль на литр

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РНК – рибонуклеиновая кислота

рРНК – рибосомальная рибонуклеиновая кислота

пре-мРНК - предшественник матричной рибонуклеиновой кислоты

с – секунда

2'-О-Me – 2'-О-метилирование рибозы

3'-SS – 3'-splice site

5'-SS - 5'-splice site

ALDH1A3 – aldehyde dehydrogenase 1 family, member A3

ALDH3A2 – aldehyde dehydrogenase 3 family, member A2

AS – alternative splicing

BP – branch point

CL – classical subtype of GBM

CD133 – cluster of differentiation (prominin-1)

CD44 – cluster of differentiation 44

CD109 – cluster of differentiation 109

DAPI – 4',6-diamidino-2-phenylindole

FBS – fetal bovine serum

GBM – glioblastoma multiforme

GFP – green fluorescent protein

GSC – glioblastoma stem cells

GSEA – Gene Set Enrichment Analysis

GSVA – Gene Set Variation Analysis

hnRNPs – heterogeneous nuclear ribonucleoproteins

IC₅₀ – half maximal inhibitory concentration

IDH – isocitrate dehydrogenase

EMT – epithelial–mesenchymal transition

LB – lysogeny broth

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

Mes – Mesenchymal cells

mESC – mouse embryonic stem cells

NMD – nonsense-mediated decay

PBS – phosphate buffered saline

PN – proneural cells

Prolif – proliferative cells

RBP – RNA-binding proteins

RFP – red fluorescent protein

RPs – ribosomal proteins

RPL22L1 - ribosomal protein L22 like 1

SILAC - stable isotope labeling by/with amino acids in cell culture

snRNA - small nuclear RNA

snRNP - small nuclear ribonucleoproteins

SRPK – serine-arginine protein kinases

SRSF – serine and arginine rich splicing factor

TCA – цикл трикарбонных кислот,

TCGA – The Cancer Genome Atlas

TMZ – temozolomide

VEGF – vascular endothelial growth factor

α -KG – α -ketoglutarate

α -HG – 2-Hydroxyglutarate

ψ – псевдоуридилирование

ВВЕДЕНИЕ

Глиобластома (GBM) — наиболее опасная форма рака головного мозга с крайне плохим прогнозом для пациентов [1]. Стандартным методом лечения GBM является хирургическая резекция и последующие радиотерапия и химиотерапия темозоломидом. Однако это лечение трудно назвать эффективным: в 90% случае возникает рецидив заболевания, который приводит к гибели пациента [2]. Немногочисленные альтернативные химиопрепараты, прошедшие клинические испытания, используются в качестве терапии второй линии, однако они также не оказывают значительного положительного действия. Таким образом, на настоящий момент глиобластома является неизлечимым заболеванием.

В чем же кроется причина неудач лечения глиобластомы? Помимо локализации опухоли в головном мозге и вытекающих из этого ограничений - невозможности ее полного хирургического удаления, малого количества лекарственных веществ, способных проникать через гемато-энцефалический барьер и др., - трудности вызывают высокая меж- и внутриопухолевая гетерогенность [3, 4]. Во-первых, опухоли пациентов сильно отличаются друг от друга, что усложняет поиск терапии, эффективной для разных пациентов. Во-вторых, внутри одной опухоли одновременно присутствуют крайне разнообразные по свойствам клетки. Так, для клеток GBM были выявлены различия на генетическом [5], эпигенетическом [5], протеомном [6] и метаболомном [7] уровнях. Кроме того, для глиобластом характерна иерархическая организация клеток, на вершине которой находятся опухолевые стволовые клетки, а ниже – их более дифференцированные потомки [8]. Таким образом, присутствие самых разнообразных по свойствам клеток приводит к тому, что фактически в любой опухоли найдётся популяция клеток резистентных к используемой терапии. В результате, GBM приобретает возможность рецидивировать с образованием более агрессивной формы опухоли, уже невосприимчивой к лечению [9]. Хотя факт присутствия разных субпопуляций клеток был обнаружен довольно давно, конкретные механизмы, приводящие к возникновению фенотипического разнообразия клеток, до сих пор мало исследованы.

Большинство работ, посвящённых изучению внутриопухолевой гетерогенности, основаны на данных транскриптомного анализа. Этот подход оказался полезен для выявления различий в профилях экспрессии генов и последующей классификации опухолевых клеток на подтипы [10, 11]. Вместе с тем очевидно, что подтипы клеток различаются не только транскриптомом, но и протеомом. Более того, в большинстве случаев именно набор белков, присутствующих в клетках, в конечном итоге определяет основные свойства опухоли.

Однако многими авторами было показано, что транскриптом и протеом опухолевых клеток плохо коррелируют друг с другом [12, 13]. Это означает, что уровни мРНК и соответствующих им белков не совпадают и изменение количеств транскрипта не обязательно влечет за собой равное изменение количеств белка. Один из механизмов, позволяющих объяснить это несоответствие, связан со строением и функционированием рибосом. Было показано, что рибосомы могут различаться входящими в них белками (*ribosomal proteins*, RPs) [14]. Так как в рибосоме RPs принимают участие в связывании факторов трансляции, а некоторые непосредственно контактируют с мРНК, присутствие тех или иных RPs может приводить к различному средству рибосом к транскриптам, а также изменениям в скорости трансляции [15]. Таким образом, вариации в RPs способствуют появлению избирательности рибосом в отношении транслируемых мРНК и за счет этого влияют на протеом клеток. Примечательно, что нарушения в экспрессии RPs характерны для разнообразных онкологических заболеваний в том числе и для GBM [16]. Интересно, что помимо изменения уровня экспрессии, функции RPs могут также регулироваться за счёт альтернативного сплайсинга их пре-мРНК. Тем не менее, на сегодняшний день опубликована всего лишь одна работа, в которой А. Брумвелл с соавторами показали, что в ответ на гипоксию изменяется сплайсинг пре-мРНК RPS24, в результате чего образуется дополнительная изоформа белка, которая может быть включена в рибосомы [17]. Однако, роль альтернативного сплайсинга пре-мРНК RPs в регуляции функционирования рибосом в глиобластоме до сих пор остаётся загадкой. В связи с этим настоящая работа посвящена исследованию влияния альтернативного сплайсинга пре-мРНК рибосомных белков на протеом и фенотип клеток глиобластомы.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Глиобластома

1.1. 1. Молекулярная гетерогенность глиобластом

Глиобластома (GBM) — одна из самых опасных форм рака головного мозга, которая возникает сразу как опухоль IV стадии и характеризуется коротким периодом жизни пациентов. Современная терапия глиобластомы состоит из хирургической резекции и дальнейшей лучевой и химиотерапии [18]. Однако несмотря на хирургические и химиотерапевтические достижения медицины, средняя выживаемость пациентов с GBM остается всего 12-15 месяцев, а с 5-летней выживаемостью не превышает 5% [19]. Это связано с тем, что клетки опухоли быстро приобретают устойчивость к терапии, из-за чего в подавляющем большинстве случаев возникает рецидив [2].

Устойчивость глиобластомы к терапии вызвана ее высокой гетерогенностью. Многочисленные исследования свидетельствуют о том, что опухоли, полученные от разных пациентов, не только сильно различаются между собой, но также имеют высокую внутриопухолевую гетерогенность [4].

Чтобы описать характеристики опухолей и установить их связь с продолжительностью жизни пациентов исследователями неоднократно предпринимались попытки создать классификацию глиобластом. Одной из первых работ, посвященных изучению межопухолевой гетерогенности, стала работа Филлипс с соавторами, в которой исследовались различия между опухолями, полученными от разных пациентов [10]. Используя данные транскриптомного анализа, авторы предложили классифицировать глиомы на три подтипа – пролиферативный (Prolif), пронеуральный (PN) и мезенхимальный (Mes) – которые имели корреляцию с выживаемостью пациентов. Для каждого подтипа была характерна активация определённых сигнальных путей, а также присутствие уникального набора мутаций. Важно, что подтип PN был связан с лучшим прогнозом для пациентов, в то время как Prolif и Mes подтипы коррелировали с более плохим прогнозом. Сходные данные были получены и в работах Вархаак и Мао [11, 20].

Кроме того, было установлено, что глиобластомы различаются и по эпигенетическим характеристикам. В зависимости от метилирования CpG-островков глиомы подразделяют на несколько подтипов, названных M1-M6 (рис. 1), среди которых кластер M5 – это опухоли с повышенным метилированием CpG-островков (G-CIMP, от англ. *Glioma CpG Island Methylator Phenotype*), а к кластеру M6 относятся опухоли с гипометилированием [21]. Проведя сравнение данной классификацией с ранее предложенной Филлипс, авторы установили, что кластеры M5 и

М6 включают в себя опухоли PN-подтипа, в кластер М1 входят мезенхимальные GBM, а М3 был характерен для GBM классического подтипа (рис. 1). Кроме того, выявленные сигнатуры метилирования ДНК коррелируют с клиническими, соматическими и хромосомными изменениями. В частности, преимущество в выживаемости имел пациенты с G-CIMP, так как, вероятно, у них метилированы гены, способствующие более агрессивному течению заболевания, в результате чего их экспрессия оказывается пониженной [22].

● Филлипс	Пронейрональный		Пролиферативный		Мезенхимальный
● Вархаак	Пронейрональный		Нейральный	Классический	Мезенхимальный
● Бреннан	М5 (G-CIMP)	М6		М3,М4	М1,М2

Рис. 1. Варианты разделения GBM на подтипы и их соответствие друг другу. Для выделения разных подтипов Филлипс с соавторами использовали метод микрочипов для анализа экспрессии генов в образцах опухолей, полученных от пациентов. Вархаак с соавторами классифицировали опухоли по данным базы TCGA, полученным с помощью микрочипов. Бреннан с коллегами выделяли подтипы на основе анализа метилирования методом микрочипов из базы данных TCGA [23].

Описанные выше подтипы тесно связаны с еще одним прогностическим фактором при глиомах – присутствием мутации в белке изоцитратдегидрогеназе (IDH) [24]. Изоцитратдегидрогеназы IDH1 и IDH2 катализируют окислительное декарбоксилирование изоцитрата до α -кетоглутарата (α -KG). IDH1 и IDH2 локализованы в цитоплазме и митохондриях соответственно. Мутации происходят в R132 цитозольной IDH1 и в R172 митохондриальной IDH2 и приводят к тому, что IDH1 и IDH2 приобретают способность катализировать восстановление α -KG до α -гидроксиглутарата (α -HG) (рис. 2) [25]. Известно, что α -HG действует как антагонист α -KG, конкурентно ингибируя ряд α -KG-зависимых диоксигеназ, включая гистоновые деметилазы (KDM) и семейство ферментов TET, которые являются ДНК-гидроксилазами, катализирующими ряд реакций, итогом которых также является деметилирование ДНК [25]. В соответствии с этим было показано, что мутации в IDH характерны для менее агрессивных глиом с G-CIMP. Однако, для глиобластом, являющихся самым опасным типом глиом, характерно наличие IDH дикого типа, что приводит к меньшей продолжительности жизни пациентов и более агрессивному течению заболевания [26].

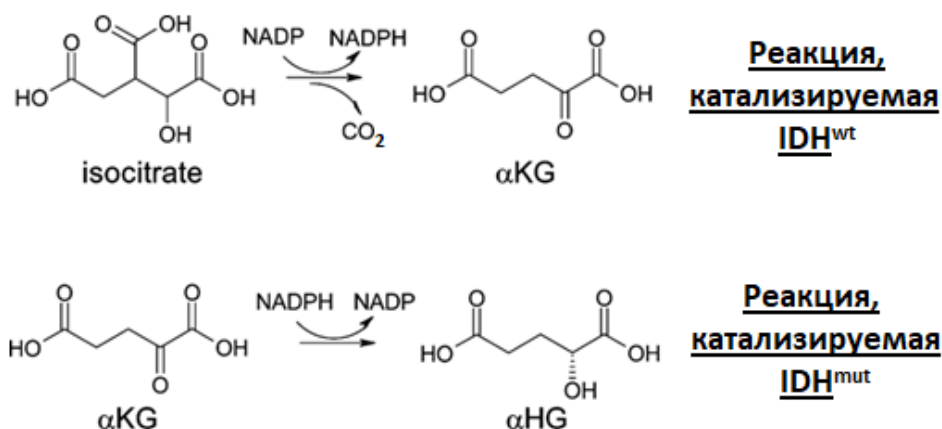


Рис. 2. Схематичное изображение реакции, катализируемой IDH в норме (сверху) и при наличии мутации (снизу).

Эксперименты по секвенированию единичных клеток, взятых из одной и той же опухоли GBM показали, что опухоли не гомогенны, а состоят из смеси клеток с различными фенотипами (PN, Mes, CL) (внутриопухолевая гетерогенность). В этом же исследовании авторы сделали важное наблюдение о том, что с увеличением степени клеточной гетерогенности GBM, ухудшался прогноз для пациентов [27]. Кроме того, фенотип клеток имел тенденцию изменяться после проведения лечения, формируя более агрессивную опухоль. Джин с коллегами показали, что разные субпопуляции клеток находятся в разных регионах GBM в специфических нишах. В центральной («коровой») части опухоли преобладают клетки мезенхимального подтипа, а на краю опухоли – клетки пронеурального подтипа [28]. Впоследствии оказалось, что коровые клетки способны увеличивать агрессивность и устойчивость к радиотерапии краевых клеток, а также вызывать смену их фенотипа за счет межклеточного сигналинга [29].

1.1.2. Стволовые клетки глиобластомы

Важным шагом в исследовании источников возникновения внутриопухолевой гетерогенности GBM стало открытие стволовых опухолевых клеток (*glioblastoma stem cells*, GSC), которые способны к самообновлению и дифференцировке (рис. 3). Предполагается, что, по аналогии с нормальными тканями организма, GBM организована иерархически: на вершине иерархии расположены мультипотентные GSCs, а ниже – доминирующие по массе более дифференцированные опухолевые клетки [30].

Ключевыми характеристиками GSC является их способность инициировать глиобластому *in vivo* и воспроизводить гетерогенность исходной опухоли [31]. Для выявления GSC используются внутриклеточные (Sox2, Olig2, Nestin, ALDH1A3, Oct4) и поверхностные (CD133, CD44 и A2B5) маркеры [32], хотя ни один из них не является строго специфичным для GSC. С другой стороны, для идентификации дифференцированных опухолевых клеток обычно используют маркер GFAP [33].

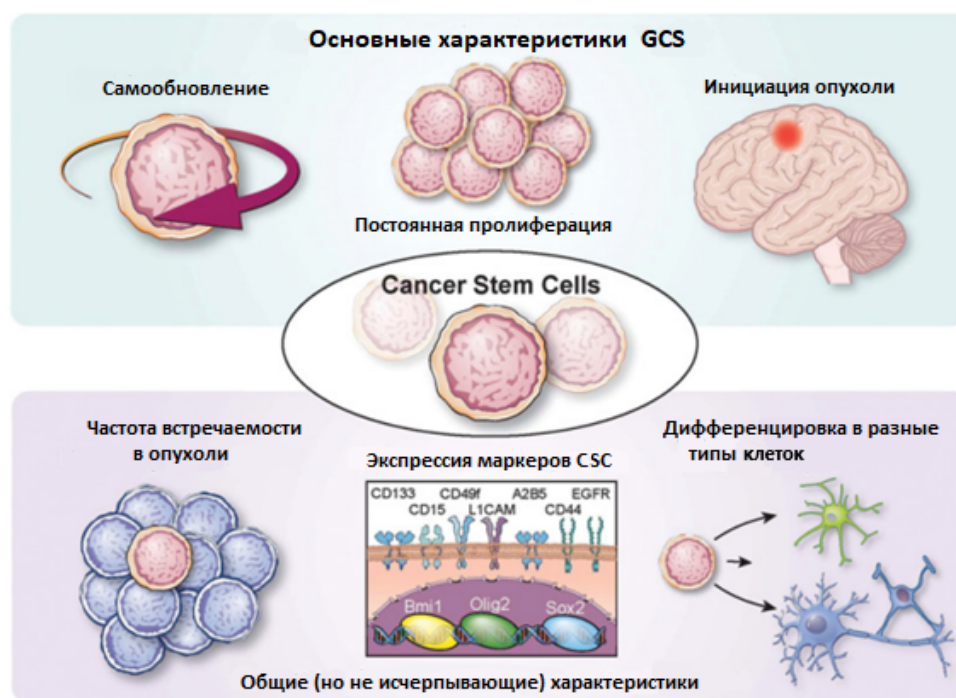


Рис. 3. Свойства стволовых клеток глиобластомы. В верхней части рисунка показаны функциональные характеристики, позволяющие идентифицировать опухолевые стволовые клетки: самообновление, постоянная пролиферация и способность инициировать опухоль в ксенотрансплантатах. В нижней части рисунка показаны свойства GSC, общие с соматическими стволовыми клетками: экспрессия маркеров стволовых клеток, способность дифференцироваться в клетки других типов [34].

Считается, что именно GSC обеспечивают радио- и химиорезистентность опухоли, а также возникновение рецидивов [33]. Так, клетки, экспрессирующие маркер CD133, в ответ на облучение могут запускать механизмы репарации ДНК и восстанавливать повреждения более эффективно, чем CD133-негативные опухолевые клетки [34]. Также GSC способны адаптироваться к действию химиопрепарата темозоломид (TMZ). Было показано, что TMZ-резистентные GSC имеют более высокие уровни экспрессии нескольких антиапоптотических генов, таких как BCL-2, BCL2-L1 и MCL1 по сравнению с дифференцированными клеточными

линиями [35]. В результате, выжившие после терапии GSC способны вновь инициировать опухоль.

GSC также гетерогенны и классифицируются по разным признакам. Так, на основе профилей экспрессии генов GSC, как и клетки основной массы опухоли, подразделяются на мезенхимальные (MES GSC) и пронеуральные (PN GSC) [36]. Оба подтипа одновременно встречаются в одной опухоли, но в разных областях. PN GSC располагаются в периваскулярных нишах и на краю опухоли, в то время как MES GSC в основном расположены в некротической нише [37]. Свойства этих клеток также различаются: PN GSC в большей степени способствуют ангиогенезу, тогда как MES GSC проявляют высокую радио- и химиорезистентность, а образуемые ими опухоли более агрессивны [36].

По биологическому поведению GSC подразделяют на qGSC (*quiescent GSCs*, «покоящиеся» GSCs) и pGSC (*proliferative GSCs*, «пролиферирующие» GSCs) [36]. Как следует из названия, pGSC характеризуются более высоким уровнем пролиферации по сравнению с qGSC. Доказано, что химиотерапия и лучевая терапия убивают pGSC, но не способны убить qGSC [38]. Уменьшение количеств pGSC стимулирует мультипотентные qGSC вступать в клеточный цикл и восполнять опухолевую ткань. Предполагается, что оставшиеся в опухоли в конце лечения qGSC переходят в пролиферативное состояние и вновь формируют опухоль, что в итоге приводит к рецидиву [36]. Также установлено, что под действием неблагоприятных внешних условий (гипоксии или кислой среды микроокружения) и радио- и химиотерапии pGSC могут переходить из состояния «пролиферации» в состояние «покоя» (pGSC→qGSC) [38, 39]. Этот переход иллюстрирует еще один механизм возникновения устойчивости опухолей к лечению.

Как было сказано ранее, до сих пор нет возможности однозначного определения GSC. Поэтому продолжают споры относительно структуры и неизменности клеточной иерархии при глиобластоме. Некоторые исследователи подвергают сомнению иерархическую модель из-за растущего количества данных, свидетельствующих о том, что «стволовость» является специфическим клеточным состоянием, формирующимся под действием микроокружения (рис. 4) [40]. Как оказалось, микроокружение не только стимулирует дифференцировку опухолевых стволовых клеток, но может запускать обратные процессы дедифференцировки, в результате которых клетки вновь приобретали характеристики стволовых [41]. Действительно, хотя первоначально предполагалось, что только GSC способны образовывать опухоли, позднее оказалось, что различия в онкогенном потенциале GSC и не-GSC клеток невелики [42], а несколько исследований показали, что в GBM клетки с маркерами GSC могут быть получены из

дифференцированных клеток и успешно воссоздать исходную внутриопухолевую гетерогенность [41, 42, 43].



Рис. 4. Изображение динамики фенотипической гетерогенности в GBM. В верхней части рисунка изображен процесс дифференцировки нормальных нервных стволовых клеток. В нижней части изображен процесс дифференцировки GSC [39].

1.1.3. Морфологические особенности глиобластом

Большой вклад в создание внутриопухолевой гетерогенности вносит микроокружение раковых клеток. В глиобластомах выделяют несколько морфологически различных зон опухоли (рис. 5). В первую очередь для GBM характерно наличие некроза. В зависимости от локализации и размера некротические зоны бывают двух типов [44]. Первый состоит из больших омертвевших участков в центре опухоли, возникших в результате недостаточного кровоснабжения или разрушения сосуда. Второй содержит небольшие некротические очаги неправильной формы. Некротическая область окружена так называемыми псевдопалисадами – активно мигрирующими клетками. По сравнению с другими зонами опухоли плотность клеток в псевдопалисадах повышена, однако скорость их пролиферации, наоборот, снижена [44]. Так как некроз часто сопровождается гипоксией, то псевдопалисодные клетки используют анаэробный тип метаболизма и из-за этого происходит закисление внеклеточного пространства [45].

Высокая васкуляризация является второй важной морфологической особенностью GBM [44]. Когда объем опухоли увеличивается настолько, что существующие сосуды перестают обеспечивать клетки необходимым количеством кислорода и питательных веществ, опухолевые клетки выделяют молекулы, способствующие неоваскуляризации (хемокины, фактор роста

эндотелия сосудов (VEGF) и др.) [46]. Однако по сравнению с нормальными тканями, сосудистая сеть GBM имеет структурные аномалии и часто не может нормально выполнять свои функции. Так, излишне расширенные или суженные просветы образующихся сосудов приводят к вазоокклюзии (слипанию стенок сосуда) и возникновению новых некротических очагов, а высокая проницаемость сосудов способствует появлению отеков, воспалению и усиленной инфильтрации иммунных клеток [47].

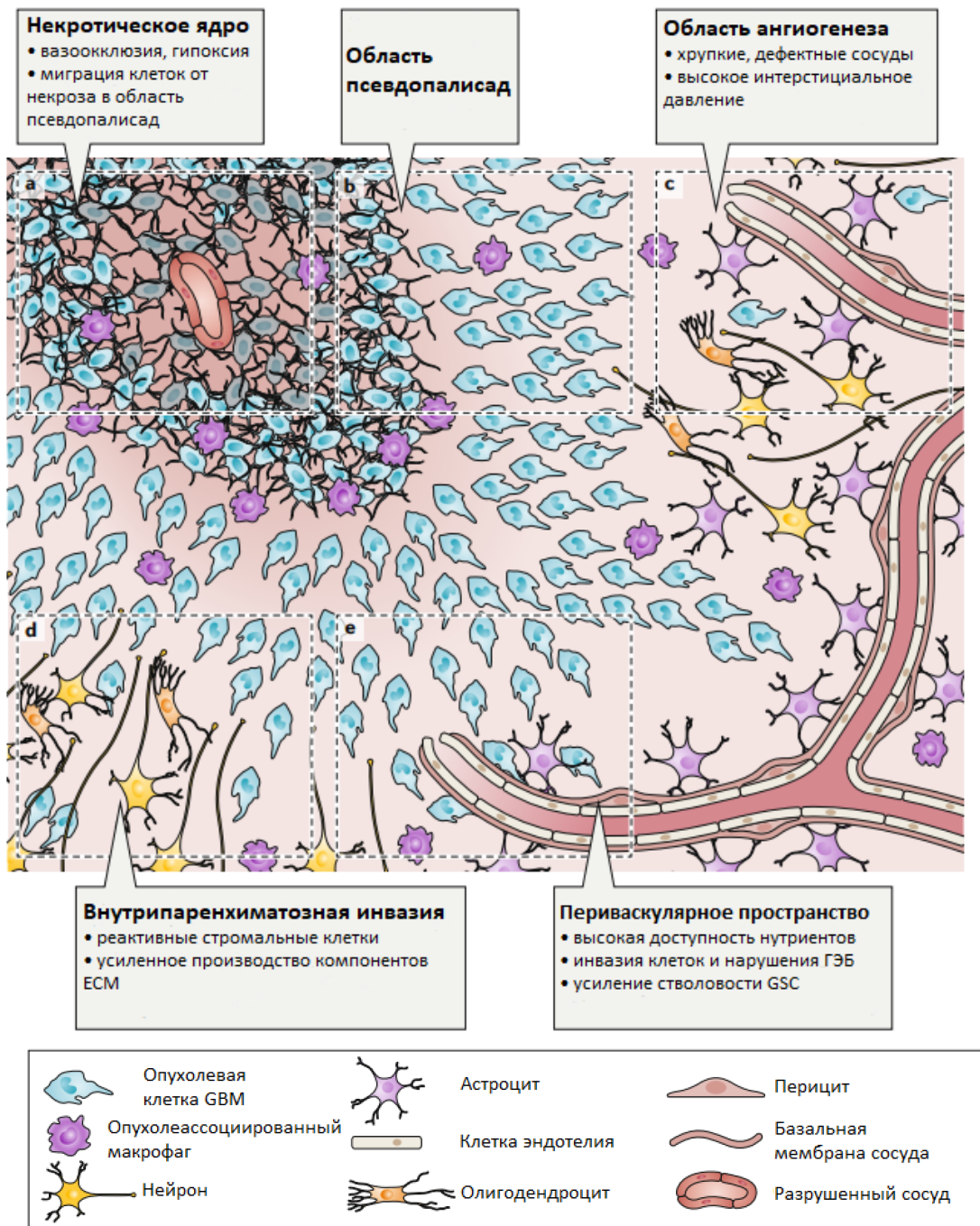


Рис. 5. Схематическое изображение различных зон GBM. На рисунке показаны различные области опухоли: инвазивный край, некротическая область, периваскулярная область, а также различные клетки: нейроны, микроглия, стволовые клетки глиобластомы и дифференцированные опухолевые клетки [51].

Еще одна важная особенность GBM – наличие инвазивного фронта, который представляет собой единичные инфильтрирующие в нормальный мозг опухолевые клетки [48]. Они не могут быть удалены в процессе хирургической операции и впоследствии вызывают рецидивы. Считается, что для миграции клеток глиом важна кровеносная сеть, так как их движение происходит вдоль сосудов [49]. Кроме того, располагаясь рядом с сосудами, клетки GBM нарушают контакты астроцитарных и эндотелиальных клеток с базальной мембраной, что приводит к нарушению гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) [48, 50].

1.1.4. Ацидоз в глиобластоме.

Одна из особенностей опухолевого микроокружения при глиомах – низкий внеклеточный pH (pH_e), который в центральной зоне опухоли может достигать значений в 5,9 (для сравнения – в тканях нормального мозга pH равен $\sim 7,1$) (рис. 6) [52].

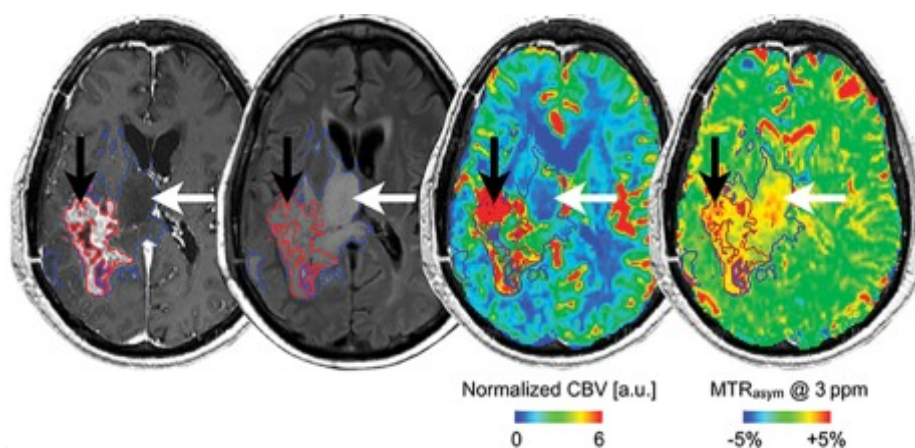


Рис. 6. МРТ головного мозга пациента с глиобластомой. Слева направо: постконтрастные T1-взвешенные изображения (показывают границы опухоли), T2-взвешенные изображения FLAIR (визуализация границ воспаления), CBV (показывает объем крови в выбранном участке; цветовая кодировка соответствует относительному объему крови, выраженному в произвольных единицах (a.u.)), и pH-взвешенные МР-изображения (показывают изменения pH; большие значения MTRassym соответствуют меньшему значению внеклеточного pH). Стрелки указывают на зоны опухоли с высокой кислотностью [53].

Причинами возникновения ацидоза являются гипоксия и возникающие из-за этого изменения в метаболизме опухолевых клеток [54, 55].

Гипоксия появляется из-за недостаточной или дефектной сосудистой сети, которая существует в опухоли [48]. Клетки отвечают на гипоксию двумя способами: либо стимулируют

формирование новых сосудов и таким образом нормализуют количество поступающего кислорода, либо изменяют тип метаболизма, что позволяет им адаптироваться к неблагоприятным условиям [56, 57, 58]. Изменение метаболизма с окислительного фосфорилирования на ферментативный гликолиз, приводит к превращению глюкозы в два лактат-аниона и 2H^+ . Ионы H^+ закисляют цитозоль, что нарушает работу многих внутриклеточных ферментов. Для поддержания оптимального внутриклеточного pH (pH_i) клетке необходимо вывести избыток H^+ . Для этого увеличивается активность различных переносчиков ионов (**рис. 7**, нижняя часть): Na^+/H^+ -обменников (NHE), АТФ-аз, а также симпортеров H^+ /лактата (в частности, МСТ1 и МСТ4), которые удаляют не только избыток H^+ , но и лактат [59]. Результаты проведенных измерений указывают на то, что в отличие от нормальных клеток, для которых характерны значения $\text{pH}_i \sim 7,2$ и $\text{pH}_e \sim 7,4$, в опухолевых клетках наблюдаются значения $\text{pH}_i > 7,4$ и $\text{pH}_e \sim 6,7-7,1$, что вызвано усиленной работой различных H^+ -транспортеров [60]. Оказавшись снаружи клетки, протоны H^+ не могут быть вымыты из внеклеточного пространства из-за удаленности кровеносных сосудов, и накапливаются в нем, закисляя микроокружение.

Превращение глюкозы в лактат и сопутствующее выделение в межклеточное пространство ионов H^+ характерно для клеток, находящихся в условиях глубокой гипоксии [61]. Однако, согласно последним данным, области низкого pH_e не всегда совпадают с высокогипоксическими зонами. Ряд исследователей считает, что наибольшее закисление характерно для областей с умеренным недостатком кислорода (**рис. 7**, средняя часть). Низкие количества O_2 в таких зонах все же остаются достаточными для поддержания митохондриального дыхания, которое сопровождается образованием CO_2 . Молекула углекислого газа неполярна и поэтому может свободно диффундировать сквозь клеточную мембрану. Закисление внеклеточного пространства в этом случае происходит из-за гидратации CO_2 на поверхности клетки под действием фермента карбоангидразы СА-IX. После этого ионы H^+ остаются во внеклеточном пространстве, подкисляя его, а HCO_3^- экспортируется в клетку с помощью $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ ко-транспортеров (NBC), где выступает в роли буфера, связывая внутриклеточные ионы H^+ под действием карбоангидразы СА-II, что приводит к образованию молекулы CO_2 и воды [61].

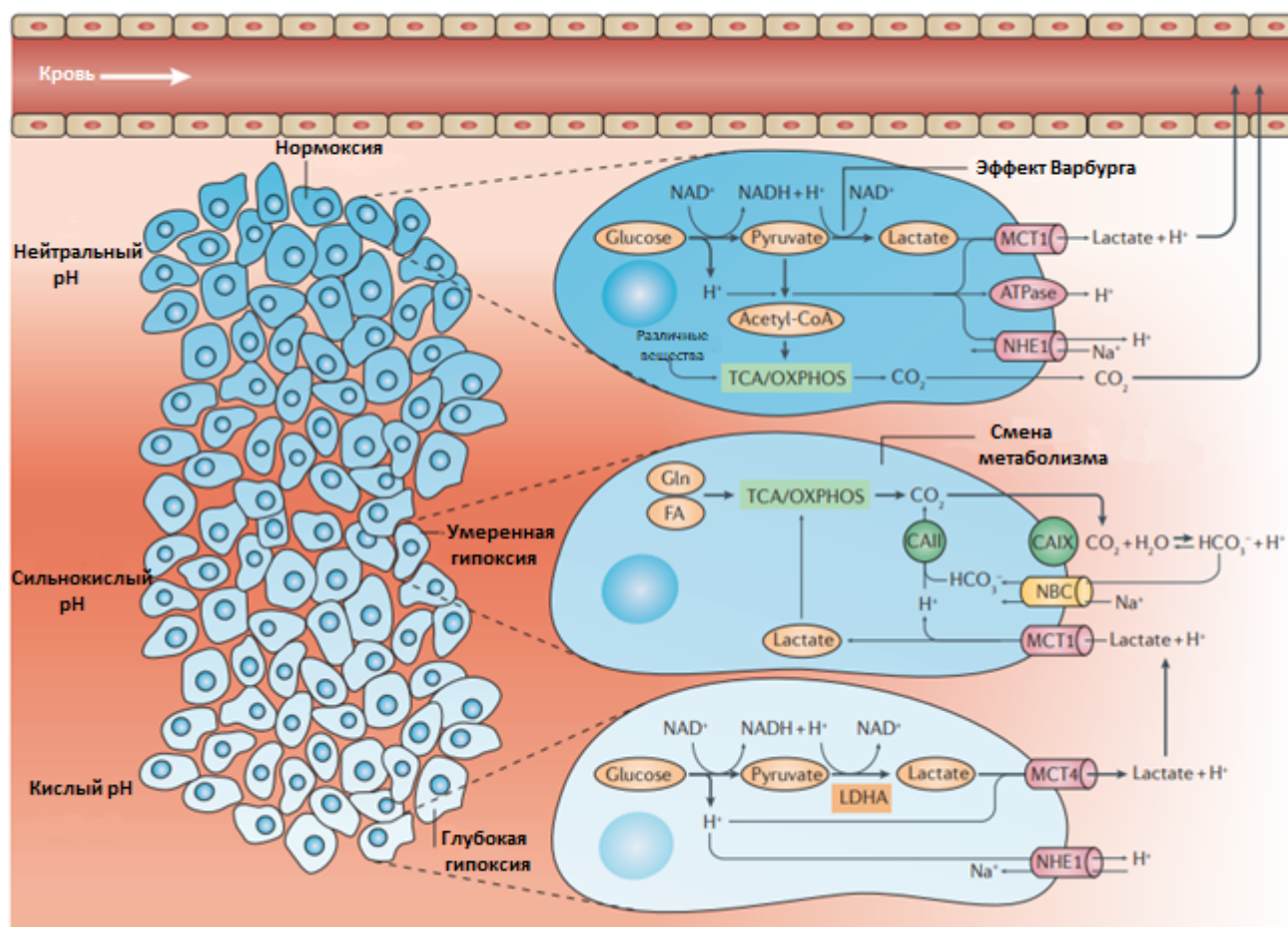


Рис. 7. Иллюстрация молекулярных механизмов закисления опухолевого микроокружения в зависимости от удаленности от кровеносных сосудов и уровня гипоксии. Верхняя часть рисунка показывает клетки, находящиеся в условиях нормоксии и осуществляющие аэробный гликолиз. В верхней части рисунка также обозначен эффект Варбурга. Средняя часть рисунка иллюстрирует клетки, находящиеся в условиях умеренной гипоксии. Показаны процессы, дополнительно приводящие к образованию CO_2 : метаболизм лактата, окисление жирных кислот, глутаминолиз. Нижняя часть рисунка изображает клетки, находящиеся в условиях глубокой гипоксии, которые полагаются на анаэробный гликолиз. Обозначения на рисунке: OXPHOS – окислительное фосфорилирование, TCA – цикл трикарбоновых кислот, Lactate – лактат, Glucose – глюкоза, Pyruvate – пируват, LDHA – лактатдегидрогеназа, NBC – $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ - транспортер [61].

В дополнение к вышесказанному стоит отметить, что в хорошо оксигенированных областях опухоли может наблюдаться так называемый эффект Варбурга, при котором раковые клетки начинают превращать глюкозу в молочную кислоту даже в присутствии кислорода (аэробный гликолиз) (рис. 7, верхняя часть и рис. 8) [62]. Этот тип метаболизма оказался характерен для MES клеток GBM [63]. С энергетической точки зрения анаэробный гликолиз невыгоден для клеток: из одной молекулы глюкозы образуется всего 2 молекулы АТФ (для сравнения: при гликолизе и последующем окислительном фосфорилировании из одной молекулы глюкозы образуется 36 молекул АТФ). Тем не менее, такое метаболическое

перепрограммирование может быть полезно для быстро пролиферирующих клеток, в том числе и опухолевых. Так, например, гликолиз является источником углерода и для предшественников липидов. Промежуточный продукт гликолиза – дигидроксиацетонфосфат – является предшественником глицерол-3-фосфата, который имеет важное значение в биосинтеза фосфолипидов и триацилглицеринов – основных структурных липидов в клеточных мембранах. Таким образом, целью эффекта Варбурга может являться не производство АТФ, а образование достаточного количества промежуточных веществ, необходимых активно пролиферирующим клеткам для синтеза новых макромолекул; закисление внеклеточной среды является побочным эффектом данного процесса [62, 64].

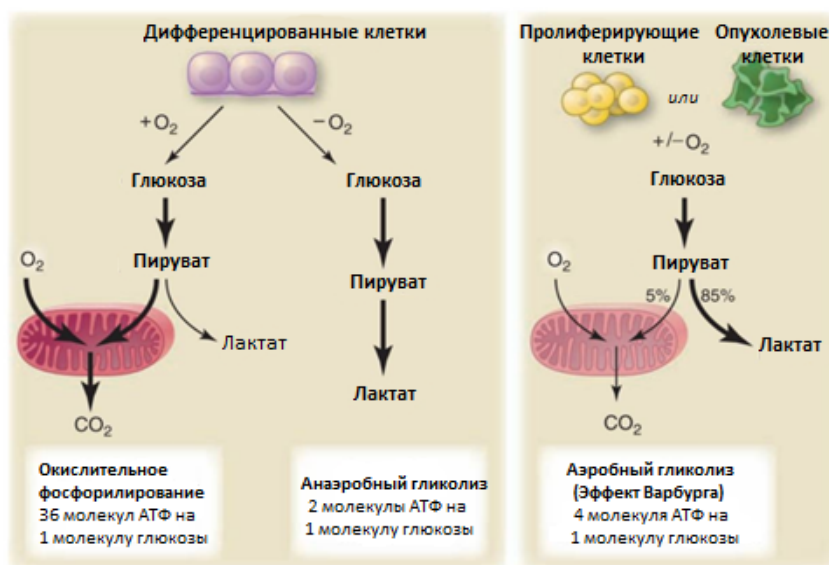


Рис. 8. Схематическое изображение различий между окислительным фосфорилированием, анаэробным гликолизом и аэробным гликолизом. Слева изображены пути метаболизма глюкозы нормальными клетками: окислительное фосфорилирование и анаэробный гликолиз. Справа изображен путь аэробного гликолиза, характерный для опухолевых клеток [62].

1.1.5. Последствия ацидоза при глиобластоме.

Многочисленные исследования позволяют говорить о том, что при глиомах ацидоз усиливает стволовость клеток глиобластомы и повышает агрессивность опухоли [52, 65]. А. Хейльмеланд с соавторами установили, что кислая внешняя среда способствует экспрессии маркеров стволовых клеток глиобластомы (таких как Oct4), самообновлению GSCs и общему росту опухоли [52]. Согласно другим исследованиям клетки глиобластомы, подвергшиеся воздействию более кислых условий, проявляют повышенную устойчивость к химиотерапевтическим средствам [65] и повышенную экспрессию фактора роста эндотелия сосудов VEGF [66] – свойства, также характерные для GSCs.

Одной из причин формирования более агрессивного фенотипа опухолевых клеток при подкислении микроокружения является изменение их транскриптома в ответ за снижение рН_e [67, 68]. Так группа Кондо установила, что снижение рН_e приводит к усилению экспрессии транскрипционного фактора SREBP2 и его связывание с промоторами генов-мишеней, участвующих в биосинтезе холестерина: ацетил-КоА-синтетаза 2 (ACSS2), 3-гидрокси-3-метилглутарил-КоА-синтаза 1 (HMGCS1), рецептор липопротеинов низкой плотности (LDLR). Увеличение экспрессии этих рН-чувствительных ферментов, происходящее в ответ на снижение рН_e может быть полезно для выживания раковых клеток, так как позволяет перенастроить метаболизм для существования в агрессивной внешней среде [67].

Закисление микроокружения также может влиять на сплайсинг пре-мРНК, индуцируя экспрессию изоформ, связанных со злокачественными новообразованиями. Например, в исследованиях рака молочной железы в ответ на закисление внешней среды происходило включение экзона 19 CD44, необходимого для лекарственной устойчивости, и включение экзона 4 (INV) Mena, который способствовал клеточной инвазии и метастазированию [68]. В другой работе авторы обнаружили вызванное кислым рН_e изменение сплайсинга фактора роста эндотелия сосудов VEGF с образованием изоформы VEGF₁₂₁ – более ангиогенной и онкогенной при раке молочной железы [69, 70].

1.2. Альтернативный сплайсинг в опухолях

1.2.1. Механизм сплайсинга

Развитие опухолей часто сопровождается изменениями в сплайсинге [71, 72]. В частности, изменяются паттерны альтернативного сплайсинга (AS), что приводит к возникновению новых вариантов белковых изоформ, часто способствующих онкогенезу.

Альтернативный сплайсинг осуществляется рибонуклеопротеиновым комплексом, получившим название сплайсосомы. Сборка этого сложного комплекса происходит поэтапно и осуществляется на молекуле незрелой пре-мРНК. Итогом работы сплайсосомы является удаление интронных областей из незрелого транскрипта, приводящее к образованию зрелой мРНК, которая в дальнейшем будет транслирована в белок.

Сплайсосома состоит из пяти малых ядерных рибонуклеопротеинов (snRNP). Каждый snRNP представляет собой молекулу малой ядерной РНК (*snRNA*, U1, U2, U4, U5, U6) и связанные с ней белки [72, 73] (рис. 9).

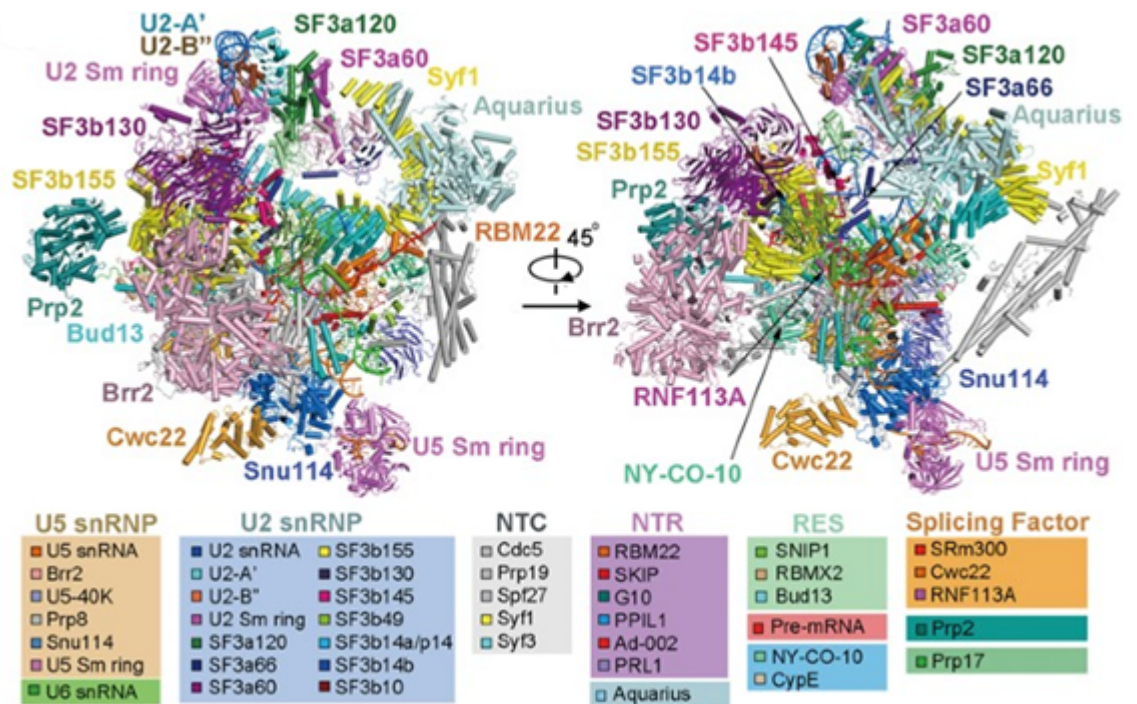


Рис. 9. Кристо-ЭМ структура активированной сплайсосомы человека (комплекс Vast). Активированная сплайсосома показана с двух ракурсов (поворот по часовой стрелке на 45°). Белковые и РНК-компоненты имеют цветовую кодировку и указаны в таблицах под изображениями. Изображенная структура включает 52 белка, три snRNA и одну пре-мРНК с общей молекулярной массой около 1,8 МДа. U2, U5 и U6 snRNA окрашены в голубой, оранжевый и зеленый цвета соответственно. Пре-мРНК окрашена в красный цвет [73].

Образование сплайсосомы начинается со сборки так называемого E-комплекса (от англ. *early* – ранний). На первом этапе U1 snRNP распознает 5'-сайт сплайсинга (5'-SS) (рис. 10). Это происходит за счет спаривания оснований 5'-конца интрона с 6-8 нуклеотидами U1 snRNA (рис. 11). Далее происходит идентификация 3'-сайта сплайсинга (3'-SS), состоящая из нескольких событий: белок SF1 (также известный как mBBP) связывается с последовательностью сайта ветвления (BP; расположен выше 3'-SS), а белки U2AF1 и U2AF2 (составляющие гетеродимер) связываются с консервативным AG-динуклеотидом на 3'-конце интрона и полипиримидиновым трактом (расположен между BP и 3'-SS) соответственно [72, 74].



Рис. 10. Основные консенсусные последовательности, участвующие в сплайсинге. Экзоны показаны прямоугольниками, интроны линиями. Указаны наиболее консервативные нуклеотиды в 5'-сайте сплайсинга (5'ss), вокруг точки ветвления (BP), полипиримидиновом тракте (PY) и 3'-сайте сплайсинга (3'ss) [75].

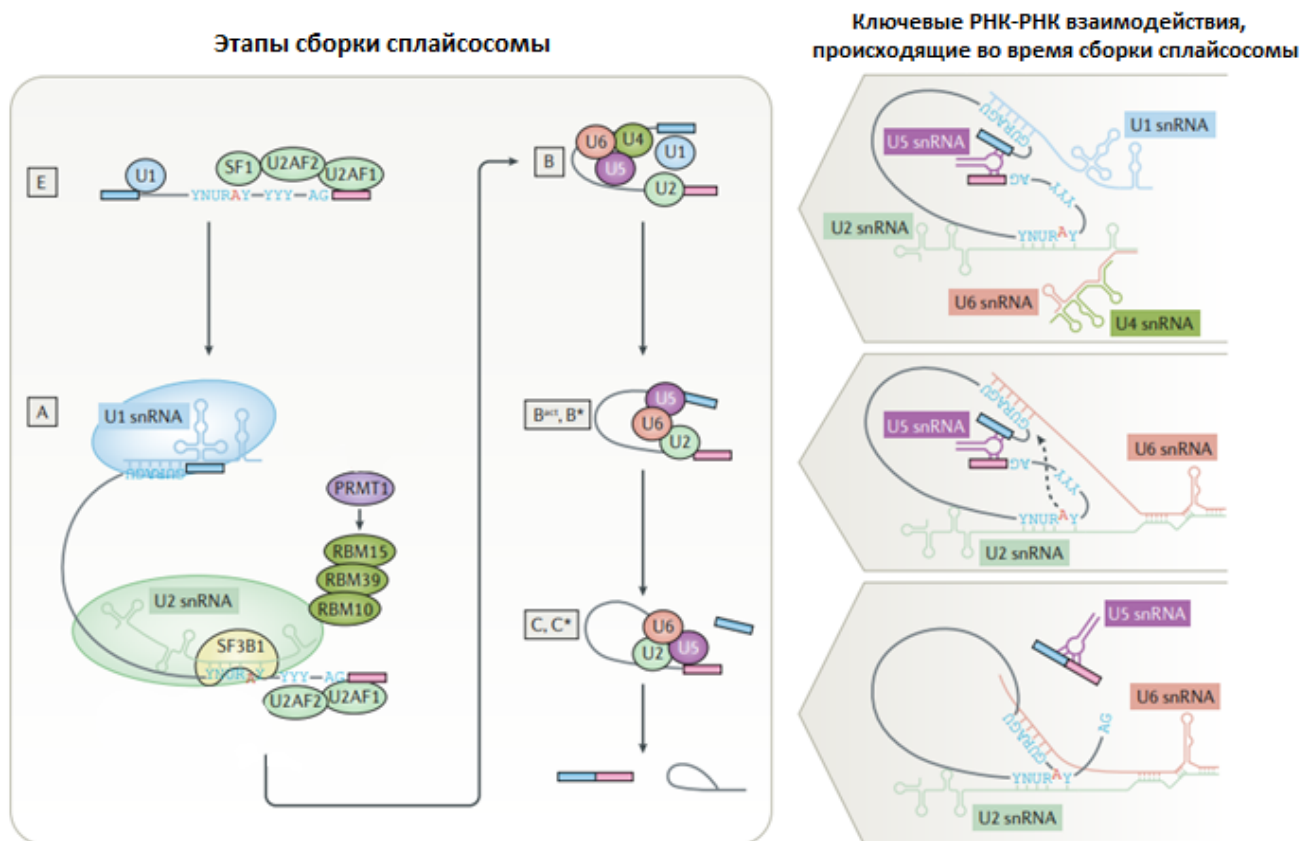


Рис. 11. Иллюстрация механизма сплайсинга пре-мРНК и сборки сплайсома. Изображены ключевые этапы сборки сплайсома. Обозначения на рисунке: R - пурин; Y - пиримидин; N - любой нуклеотид [72].

На следующем этапе U2 snRNP вытесняет SF1 и U2AF из области сайта ветвления и происходит образование комплекса А. Ключевым белковым компонентом U2 snRNP является белок SF3B1, который способствует сближению аденозина в сайте ветвления и 5'-SS [76]. После

этого тройной комплекс (tri-snRNP) U4/U6.U5 присоединяется к комплексу А, формируя комплекс В. Именно tri-snRNP после активации станет каталитическим сайтом сплайсосомы [72].

Для каталитической активации комплекса В требуется ряд конформационных и композиционных перестроек. В частности, во время активации происходит высвобождение U1 и U4 snRNP. Образующийся активированный комплекс обозначается В* или В^{act}. Затем активированная сплайсосома осуществляет первую каталитическую стадию сплайсинга (рис. 12): 2'ОН-группа аденина точки ветвления нуклеофильно атакует первый нуклеотид интрона в 5'-сайте сплайсинга, образуя промежуточную структуру в форме лассо (формируется С-комплекс (*от англ. catalytic*)). После второй каталитической стадии, во время которой освободившаяся 3'ОН-группа на 5'-конце экзона выполняет нуклеофильную атаку на последний нуклеотид 3'-сайта сплайсинга, сплайсосома диссоциирует, высвобождая зрелую мРНК и U2, U5 и U6 snRNP, которые будут повторно использоваться в последующих раундах сплайсинга [74, 76].

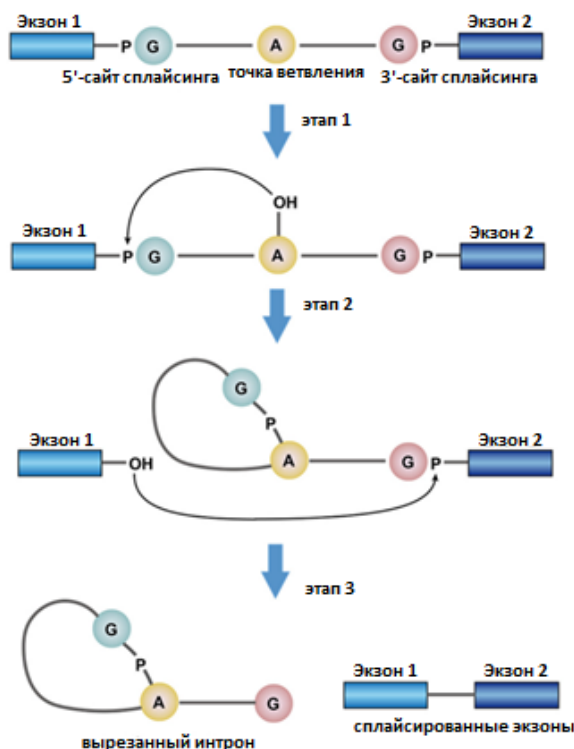


Рис. 12. Схематичное изображение каталитических реакций, осуществляемых сплайсосомой. Показаны две последовательные реакции переэтерификации, включающие разрыв и образование фосфодиэфирных связей, которые приводят к удалению интронов и соединению экзонов. На рисунке обозначены 5'- и 3'-сайты сплайсинга, точка ветвления. Стрелками изображены направления взаимодействий [76].

Как указывалось ранее, в процессе альтернативного сплайсинга из одного транскрипта могут быть получено несколько зрелых мРНК. Существуют пять основных вариантов альтернативного сплайсинга (рис.13) [77]. Наиболее распространенным типом, на который приходится почти 40% событий сплайсинга у высших эукариот, является пропуск экзона [78] –

экзон вырезается из транскрипта вместе с соседними интронами. Реже происходит удержание интрона, когда, как следует из названия, интрон остается в составе зрелой мРНК и может принимать участие в кодировании аминокислотной последовательности, либо приводит к образованию преждевременного стоп-кодона. В некоторых случаях AS используются альтернативные 5'- и 3'-сайты сплайсинга. При использовании альтернативного 5'-сайта сплайсинга изменяется 3'-граница вышестоящего экзона. При использовании альтернативного 3'-сайта сплайсинга, наоборот, изменяется 5'-граница нижестоящего экзона. Наиболее редким типом сплайсинга являются взаимоисключающие экзоны [79]. Такие экзоны не могут одновременно входить в зрелый транскрипт. При включении одного из экзонов, второй вырезается.

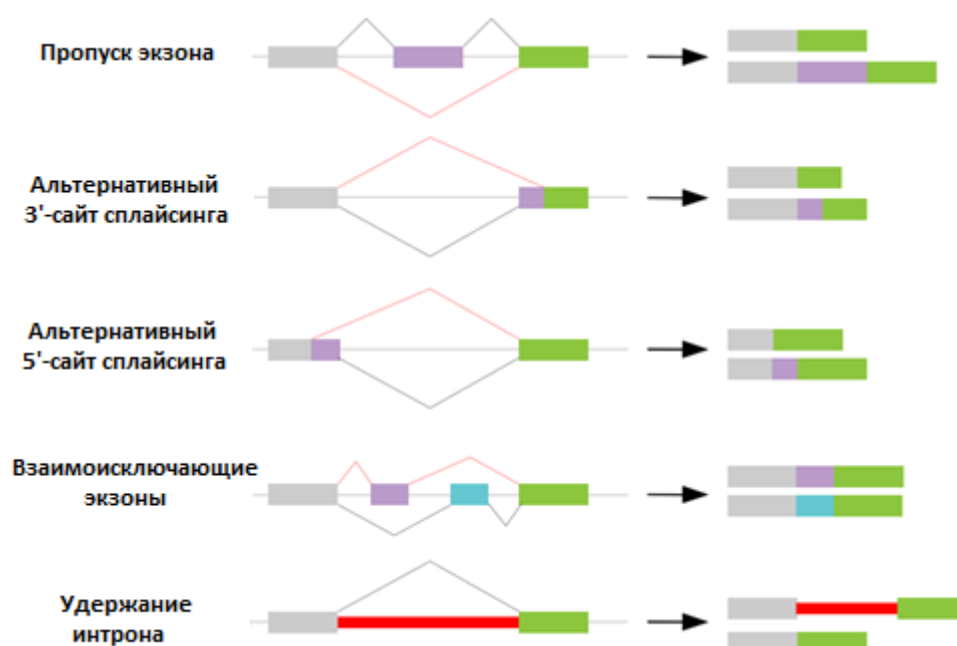


Рис.13. Типы альтернативного сплайсинга пре-мРНК: удержание интрона, пропуск экзона, выбор альтернативного сайта сплайсинга (5' и 3'), взаимоисключающие экзоны. Пре-мРНК показаны слева, варианты зрелой мРНК после сплайсинга – справа [80].

1.2.2. Изменение сплайсинга в опухолях

Выделяют несколько причин неправильного функционирования аппарата сплайсинга в опухолях. Это, в первую очередь, мутации в компонентах самой сплайсосомы. Одними из наиболее частых являются мутации в белке SF3B1, находящемся в U2 snRNA (самая распространенная – K700E [81]). В результате нарушается взаимодействие этого белка с фактором сплайсинга SUGP1 [82], что приводит к возникновению ошибок в распознавании точки ветвления. Это в свою очередь ведет к использованию 3'-криптических сайтов сплайсинга.

Основным следствием этого является потеря открытой рамки считывания, и ~50% транскриптов становятся мишенью для нонсенс-опосредованного распада (NMD), что приводит к снижению экспрессии белка [83].

snRNA, входящие в snRNP, также подвержены мутациям. Например, соматическая мутация A→C в третьем основании U1 snRNA была обнаружена в нескольких типах опухолей [84]. Эта мутация изменяет предпочтительное спаривание оснований A-U между U1 snRNA и 5'-сайтом сплайсинга на C-G и, таким образом, создает новые сплайс-варианты мРНК, кодирующие белки способствующие прогрессии опухолей.

Помимо мутаций к изменению сплайсинга приводят и нарушения активности и/или экспрессии факторов сплайсинга, которые приводят к изменению транскриптома клеток [72]. Два основных семейства факторов сплайсинга имеют определяющее значение в регуляции AS, а их экспрессия часто нарушена в опухолях. Это семейства SR-белков и гетерогенных ядерных рибонуклеопротеинов (hnRNPs) [85].

1.2.3. Механизмы регуляции сплайсинга

Распознавание экзонов – сложный процесс, для точного осуществления которого необходимы не только короткие последовательности нуклеотидов, расположенных вблизи сайтов сплайсинга (3'-SS, 5'-SS и BP). Часто для этого требуются дополнительные cis-действующие элементы в последовательности пре-мРНК (энхансеры и сайленсеры) и транс-действующие белки [72, 85].

Cis-элементы могут усиливать сплайсинг (энхансеры) или подавлять (сайленсеры). Если эти элементы располагаются в интронной области, то их называют интронными энхансерами и сайленсерами (ISE и ISS соответственно), а если располагаются в экзонах – экзонными энхансерами и сайленсерами (ESE и ISE соответственно) [85]. Большинство этих регуляторных элементов встречаются рядом с сайтами сплайсинга, но могут находиться на удалении. Энхансеры и сайленсеры – это, как правило, короткие последовательности, с которыми взаимодействуют РНК-связывающие белки (*RNA-binding proteins*, RBP), к которым относят семейство SR-белков (рис. 14). RBP являются транс-факторами и распознают cis-элементы с различной специфичностью, способствуя выявлению экзона.

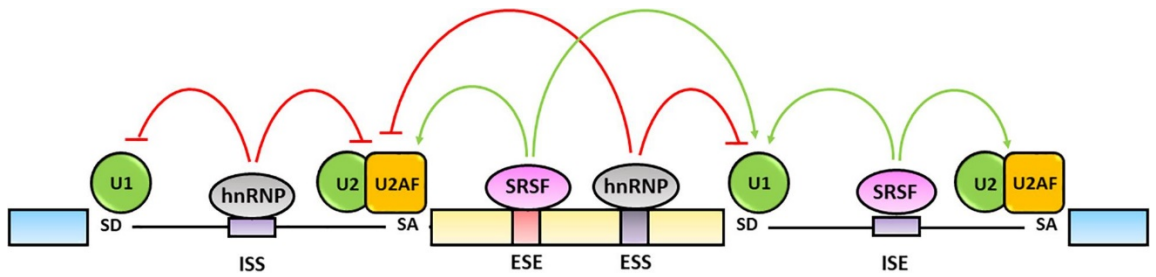


Рис. 14. Иллюстрация регуляции сплайсинга цис- и транс-элементами. Белки SR-семейства (показаны фиолетовыми овалами) способствуют сборке сплайсосомы за счет взаимодействий с ее компонентами (взаимодействия показаны зелеными стрелками) и таким образом усиливают сплайсинг; белки семейства hnRNPs (показаны серыми овалами) ингибируют сборку сплайсосомы (красные линии) и за счет этого ослабляют сплайсинг [85].

1.2.3.1. Структура SR-белков

Семейство SR-белков насчитывает 12 представителей (SRSF1-12). Эти белки в своей структуре имеют один или два мотива распознавания РНК (*RNA recognition motif*, RRM) на N-конце и богатый аргинином и серином RS-домен переменной длины на C-конце (рис. 15). Домены RRM распознают РНК, а RS-домены опосредуют разнообразные белок-белковые и белок-РНК взаимодействия, которые регулируются фосфорилированием данного домена [86].

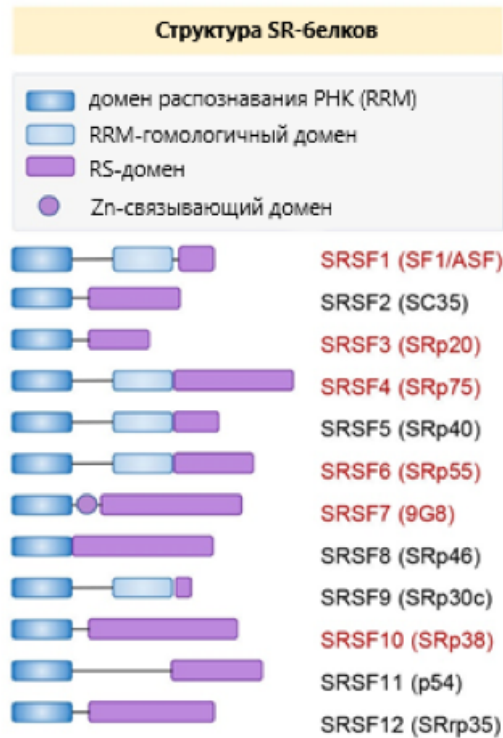


Рис. 15. Список SR-белков и их домены. Обозначения доменных структур белков показаны в рамке наверху рисунка. В скобках рядом с названиями белков указаны их альтернативные названия. SR-белки, перемещающиеся между ядром и цитоплазмой, обозначены красным шрифтом [86].

1.2.3.2. Функции SR-белков в альтернативном сплайсинге

SR-белки могут влиять на процесс альтернативного сплайсинга, за счет участия в распознавании сайтов сплайсинга (рис. 16). Эти белки взаимодействуют с экзонными энхансерами сплайсинга (ESE) и таким образом могут способствовать включению экзонов [85]. Эти взаимодействия особенно важны во время формирования и стабилизации E-комплекса. Как мы указывали ранее, при образовании комплекса E происходит связывание U1 snRNP и вспомогательных факторов сплайсинга (U2AF1 и U2AF2) с 5'-SS и 3'-SS соответственно. Этой стадии могут способствовать взаимодействия SR-белков, находящихся на ESE, с компонентами будущей сплайсосомы. Во-первых, на 5'-SS RS-домен SR-белков взаимодействует с компонентом U1 snRNP – белком snRNP70, облегчая его связывание с пре-мРНК. В частности, такой механизм был показан для SRSF1 [87]. Во-вторых, RRM-домен SR-белков (например, SRSF1, SRSF2 [88, 89]) может взаимодействовать с U2AF1 и U2AF2 на 3'-SS, помогая в распознавании этого сайта сплайсинга. Предполагается, что во время образования комплекса A SR-белки способствуют связыванию U2 snRNP с последовательностью точки ветвления. Например, RS-домен SRSF2 взаимодействует с фосфодиэфирным остовом U2 snRNA, нейтрализуя его отрицательный заряд, и усиливает спаривание оснований между пре-мРНК и U2 snRNA [90]. Кроме того, было обнаружено, что SRSF2 способствует привлечению комплекса U4/U6.U5 tri-snRNP к пре-мРНК. Это возможно за счет взаимодействия его RS-домена с фосфодиэфирным остовом U6 snRNP вблизи 5'-SS, что способствует связыванию U6 snRNA с пре-мРНК [91]. Таким образом, SR-белки повышают эффективность, с которой U-snRNP обнаруживают сайты сплайсинга, и это крайне важно в случае слабых сайтов сплайсинга, которые могут быть пропущены сплайсосомой [92].

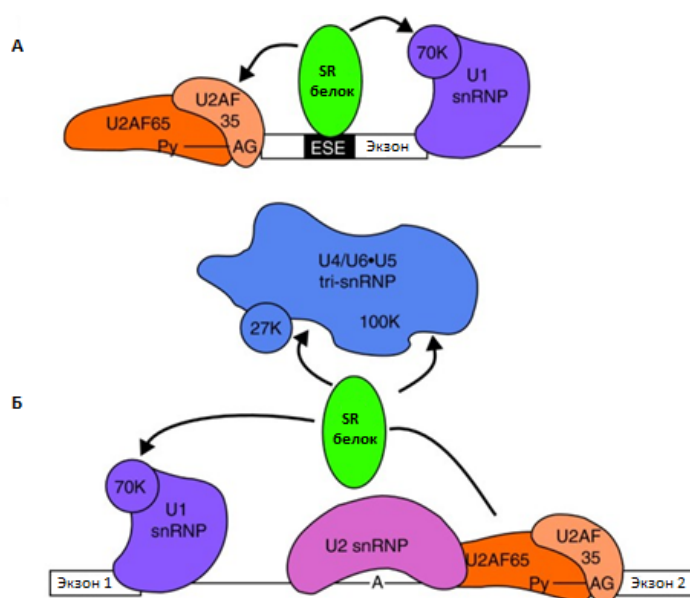


Рис. 16. Схематическое изображение участия SR-белков в сплайсинге. SR-белки обозначены зеленым цветом. (А) Изображен SR-белок, связанный с экзонным энхансером сплайсинга (ESE), и взаимодействующий с факторами сплайсинга U2AF на 3'-сайте сплайсинга, и U1 snRNP на 5'-сайте сплайсинга. (Б) Проиллюстрированы экзон-независимые функции SR-белков: взаимодействие с U1 snRNP, U2AF и U4/U6 U5 tri-snRNP. Py – полипиримидиновый тракт [93].

1.2.3.3. Регуляция активности SR-белков

Активность и локализация SR-белков регулируется фосфорилированием их RS-домена [94]. Два семейства киназ являются основными регуляторами этого процесса: SR-белок-специфические киназы (SRPKs) и CDC-подобные киназы (Clk), которые действуют совместно [94] (рис. 17). Эти киназы обладают сходными способностями фосфорилировать остатки серина по всему домену RS, но различаются по внутриклеточной локализации и механизму фосфорилирования [95]. SRPK обнаруживаются как в цитоплазме, так и в ядре, и при необходимости могут перемещаться между ними, а Clk постоянно находятся с SR-белками в ядерных спеклах.

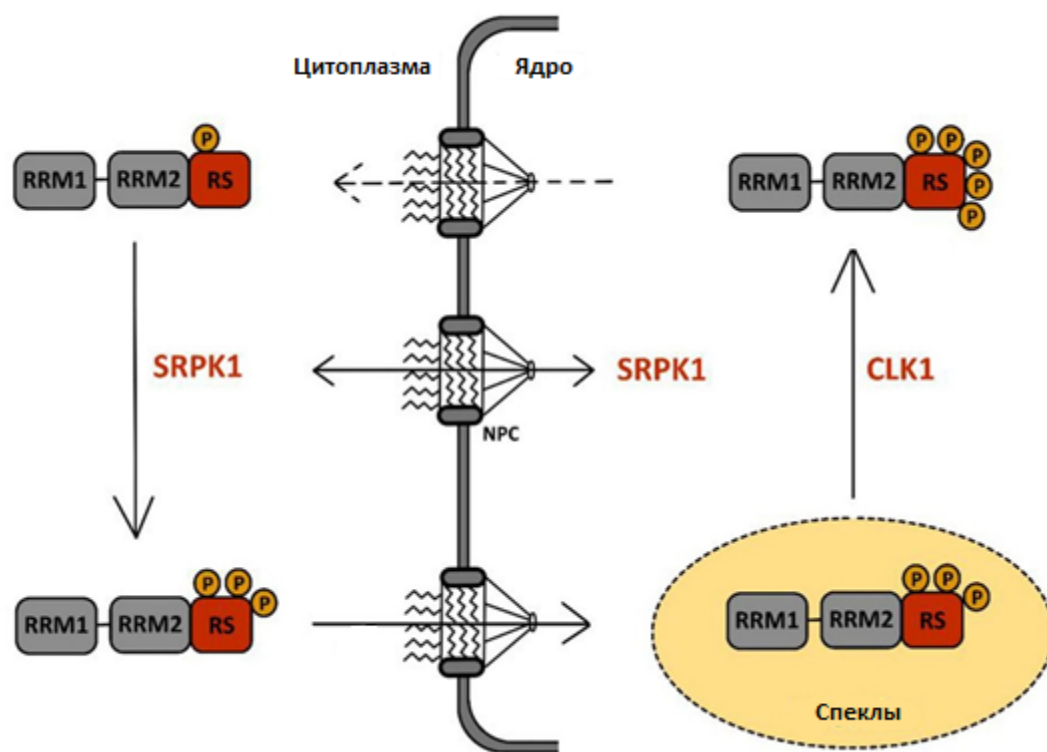


Рис. 17. Схематичное изображение цикла фосфорилирования SR-белков киназами SRPK и Clk. Обозначения на рисунке: RRM1 и RRM2 – мотивы распознавания РНК, RS – RS-домен, P – фосфат, NPC – комплекс ядерной поры [95].

SR-белки могут перемещаться между ядром и цитоплазмой [94]. Импорт из цитоплазмы в ядро возможен только после частичного фосфорилирования RS-домена цитоплазматической киназой SRPK1 [95]. Дальнейшее гиперфосфорилирование Clk1-киназой необходимо для высвобождения SR-белков из ядерных спеклов и привлечения их к участию в сплайсинге [95]. Хотя фосфорилирование SR-белков необходимо для сборки сплайсосомы, их частичное дефосфорилирование также важно для катализа сплайсинга, что указывает на то, что SR-белки регулируют сплайсинг, подвергаясь динамическим циклам фосфорилирования-дефосфорилирования. Был выявлен точный биохимический механизм того, как фосфорилирование белка SRSF1 способствует ранней сборке сплайсосомы. Чо и др. показали, что фосфорилирование SRPK-киназами N-концевой области RS-домена SRSF1 усиливает его связывание со специфическими энхансерами сплайсинга на РНК-мишени. Дальнейшее фосфорилирование Clk-киназой оставшейся части RS-домена открывает RRM на SRSF1 для связывания белка snRNP70, способствуя образованию тройного комплекса, необходимого для привлечения U1snRNP в 5'-SS (рис. 18) [96].

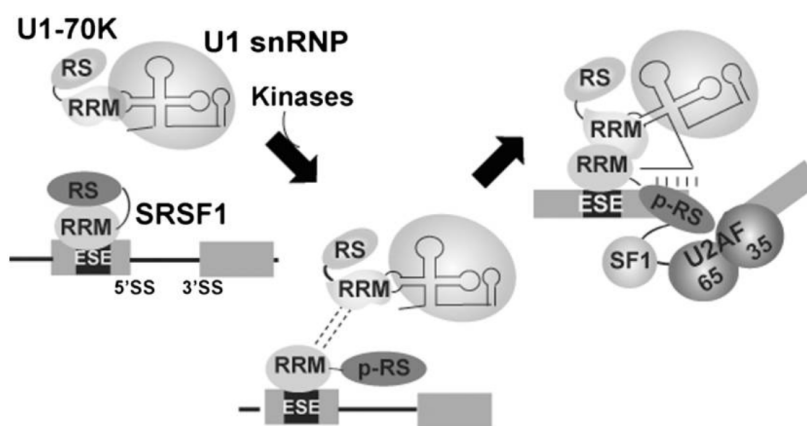


Рис. 18. Модель, изображающая влияние фосфорилирования *RS* на образование комплекса *E*. Фосфорилирование домена *RS* *SRSF1*, опосредованное последовательными действиями *SRPK1* и *Clk*, индуцирует внутримолекулярную диссоциацию *RS* от *RRM*. Открывшийся *RRM* привлекает *U1 snRNP* в 5'-сайт сплайсинга за счет взаимодействия *RRM-RRM* между *SRSF1* и *snRNP70*. Высвобожденный домен *pp-RS* взаимодействует с факторами сплайсинга, связанными с *BP/PY/3'SS*, для стабилизации комплекса *E* [96].

После завершения реакции сплайсинга SR-белки либо будут повторно использованы в новом раунде сплайсинга, либо примут участие в экспорте зрелой мРНК из ядра в цитоплазму [97, 98].

1.2.3.4. SR-белки в опухолях

Появляется все больше данных о связи между нарушениями экспрессии SR-белков и онкогенезом. Установлено, что количество копий генов SR-белков увеличено при различных видах рака. Например, было обнаружено, что *SRSF6* амплифицирован при раке легких, толстой кишки и молочной железы [99], экспрессия *SRSF7* повышена при раке желудка [100], а *SRSF3*, *SRSF6* и *SRSF9* имеют более высокий уровень экспрессии при колоректальном раке [101].

Нарушения экспрессии SR-белков приводит к изменениям паттернов альтернативного сплайсинга важнейших генов, которые влияют на пролиферацию, апоптоз и миграцию клеток и тем самым способствуют онкогенезу [72, 101]. Например, в клетках рака молочной железы экспрессия *SRSF1* изменяет сплайсинг онкосупрессорного белка *BIN1*, который в свою очередь взаимодействует с с-Мус и ингибирует его активность. Образование новой сплайс-изоформы *BIN1* происходит за счет включения экзона 12A и снижает опухолесупрессорную активность

BIN1, препятствуя его связыванию с c-MYC [102]. Также было установлено, что при раке предстательной железы SRSF1 способствует увеличению количества сплайс-изоформы онкогенного циклина D1b [103]. Повышенный уровень другого белка SR-семейства, SRSF10, в клетках рака толстой кишки способствует включению экзона 5a фактора транскрипции BCLAF1, что приводит к образованию более длинной изоформы BCLAF1-L. Эта изоформа имеет онкогенные функции за счет стимуляции экспрессии генов, участвующих в регуляции межклеточной адгезии и архитектуры цитоскелета. В результате увеличивается пролиферация и агрессивность клеток рака толстой кишки как *in vitro*, так и *in vivo* [104].

Одним из представителей SR-семейства, изучение которого представляет интерес, является белок SRSF4. К настоящему моменту известно, что SRSF4, как и некоторые другие SR-белки, встречается как в ядре, так и в цитоплазме и может перемещаться между ними [105]. Фосфорилирование SRSF4 осуществляется киназами Clk1/4, и их ингибирование приводит к дефосфорилированию SRSF4 и потери его сплайсosomal активности [106]. SRSF4 участвует в конститутивном и альтернативном сплайсинге и может изменять экспрессию генов, регулируя удержание интронов [107, 108]. Известно, что SRSF4 связывается с экзонными последовательностями примерно на 50 нуклеотидов выше 5'-сайта сплайсинга, причем наиболее часто происходит его связывание с GA-богатыми участками [109]. Вместе с этим обнаружены и его интронные участки связывания [110]. Кроме того, некоторые исследования показали, что SRSF4 может взаимодействовать и с последовательностью точки ветвления [110]. Таким образом, вероятно, SRSF4 регулирует сплайсинг, связываясь с пре-мРНК в разных функциональных областях. Было показано, что повышенная экспрессия SRSF4 коррелирует с образованием антиапоптотической изоформы каспазы 8 – CASP8L – у пациентов с острым миелоидным лейкозом [111]. Кроме того, экспрессия SRSF4 связана с болезнями сердца [112, 113], заболеваниями репродуктивных органов, раком молочной железы [114, 115] и пролиферацией гемопоэтических клеток-предшественниц [113]. Однако роль этого белка в регуляции сплайсинга при GBM совсем не изучена.

1.3. Рибосомы как важный источник разнообразия протеома

1.3.1. Гетерогенность рибосом

Помимо альтернативного сплайсинга ключевую роль в формировании протеома играют рибосомы.

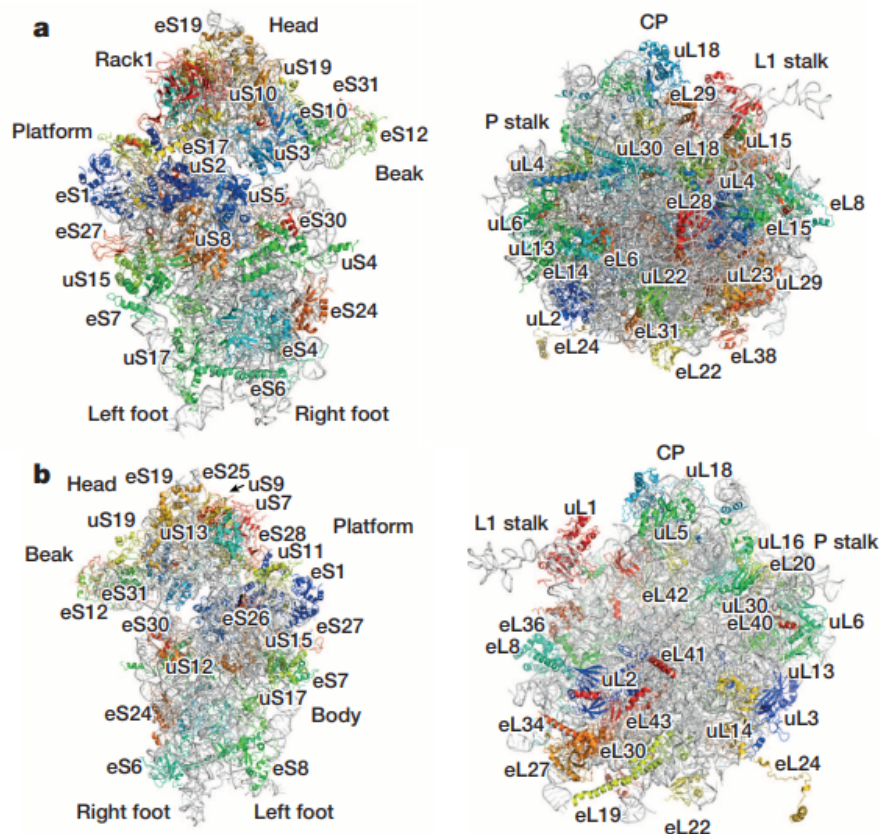


Рис. 19. Крио-ЭМ структура рибосомы человека с различных ракурсов. Рибосомные белки обозначены цветами и подписаны. Верхний ряд: слева – 40S-субъединица, справа – 60S-субъединица. Нижний ряд – то же, но с поворотом на 180° по вертикали. CP - центральный выступ [115].

У эукариот рибосомы состоят из приблизительно 80 рибосомных белков и четырех рибосомных РНК (рРНК), формирующих две субъединицы: большую (60S) и малую (40S), которые вместе образуют зрелую рибосому (моносом, 80S) (рис. 19) [115]. Долгое время рибосомы рассматривались как статичные образования, транслирующие все доступные мРНК клетки. Однако эта точка зрения была пересмотрена после недавних исследований, которые позволили говорить о существовании нескольких подтипов рибосом, отличающихся по входящим в них компонентам – рРНК и белкам [116]. Такие рибосомы могут оказывать влияние на экспрессию генов либо за счет избирательной трансляции определенного набора мРНК, либо за счет изменения эффективности трансляции (рис. 20).

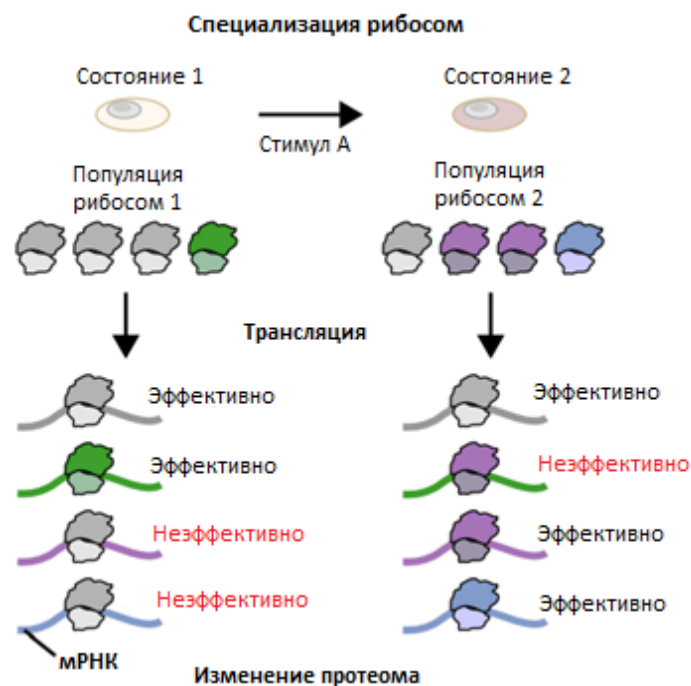


Рис. 20. Схематичное изображение регуляции трансляции специализированными рибосомами. В верхней части рисунка показаны два различных состояния клеток и существующие в этих состояниях популяции рибосом. При переходе из состояния 1 в состояние 2 появляются новые пулы рибосом (обозначены в правой части рисунка сиреневым и фиолетовым цветом), эффективность трансляции которых отличается от исходной [117].

Одна из причин гетерогенности рибосом – включение в их состав различных вариантов рРНК (**рис. 21**). В последние годы неоднократно сообщалось об обнаружении разных вариантов 5S, 5.8S, 18S, и 28S рРНК у разных организмов, в том числе и у высших эукариот [115]. Интересно, что многие аллели рРНК имели тканеспецифичную экспрессию [118]. Хотя функциональные последствия вариации в рРНК еще не установлены, моделирование *in silico* позволяет предположить, что разные варианты рРНК могут привлекать к трансляции разные мРНК [119]. Вероятно, существует некий механизм, регулирующий использование тех или иных вариантов рРНК, но для его точного описания необходимы дальнейшие исследования.

рРНК могут быть посттранскрипционно модифицированы, что также вносит огромный вклад в рибосомную гетерогенность (рис. 21). Наиболее распространенными модификациями рРНК являются 2'-О-метилирование рибозы (2'-О-Me) и псевдоуридилирование (изомеризация уридина до 5-рибозил-изомера, псевдоуридина, ψ) [115, 117, 120]. Реже встречающимся модификациям рРНК относятся ацетилирование и метилирование нуклеотидных оснований [117]. Так при сравнении различных линий раковых клеток человека было обнаружено, что примерно 70% сайтов 2'-О-me в рРНК полностью метилированы, а остальные метилированы частично [121]. К настоящему моменту опубликовано небольшое количество работ,

посвященных исследованию роли специфических сайтов 2'-О-Ме рРНК в функционировании рибосом. Например, у дрожжей при нокауте малых ядрышковых РНК (snoRNA), регулирующих процесс 2'-О-Ме рРНК, изменялись скорость роста и чувствительность к антибиотикам, действующих на рибосомы, однако изменения в трансляции в данном исследовании не оценивались [122]. Недавние исследования сообщают о динамических изменениях в 2'-О-Ме рРНК в клетках человека после оверэкспрессии онкогена *MYC* [123]. В этой же работе указывается, что делеция snoRNA, направляющей метилирование в положение цитидина C174 в 18S рРНК, значительно изменила профиль трансляции в раковых клетках: уровень трансляции части транскриптов увеличился, тогда как для других транскриптов, наоборот, понизился.

Гетерогенность рибосом также может возникать из-за различий в стехиометрии RPs, в результате чего некоторый пул рибосом может содержать одни и не содержать другие RPs. Ши с коллегами измерили абсолютное содержание 15 основных рибосомных белков в полисомах, выделенных из эмбриональных стволовых клеток мыши (mESC) [124] и обнаружили, что 6 из 15 белков присутствовали в субстехиометрических соотношениях, причем четыре из них содержались только в 60-70% полисом. Эта работа стала первым подтверждением существования активно транслирующих рибосом с отсутствием по крайней мере одного основного рибосомного белка. В этой же работе авторы впервые продемонстрировали влияние рибосомных белков на специфичность трансляции: рибосомы проявляли избирательность в отношении транслируемых молекул мРНК, что было связано с присутствием/отсутствием в рибосоме тех или иных рибосомных белков. Так авторы обнаружили, что белок RPS25 способствует трансляции мРНК белков, принимающих участие в регуляции клеточного цикла, везикулярном транспорте, а RPL10A – трансляции мРНК, кодирующих белки участвуют в развитии организма, формировании кровяных сосудов, организации внеклеточного матрикса и процессов метаболизма.

Помимо изменений в стехиометрии RPs еще один источник формирования гетерогенности рибосом – включение в состав рибосомы белков-паралогов. Этот процесс наиболее хорошо описан для дрожжей и бактерий. Интересно, что включение того или иного паралога в состав рибосомы происходит не спонтанно, а под воздействием специфических условий [125, 126]. Например, в недавних исследованиях сообщалось об экспрессии паралогов рибосомных белков у дрожжей в ответ на различные неблагоприятные внешние воздействия (воздействие ингибиторов трансляции, осмотический шок) [125]. Аналогичная ситуация оказалась характерна для *E. Coli*, где экспрессия паралога bL31A, характерного для фазы экспоненциального роста, при переходе к стационарной фазе сменяется на экспрессию bL31B [126].

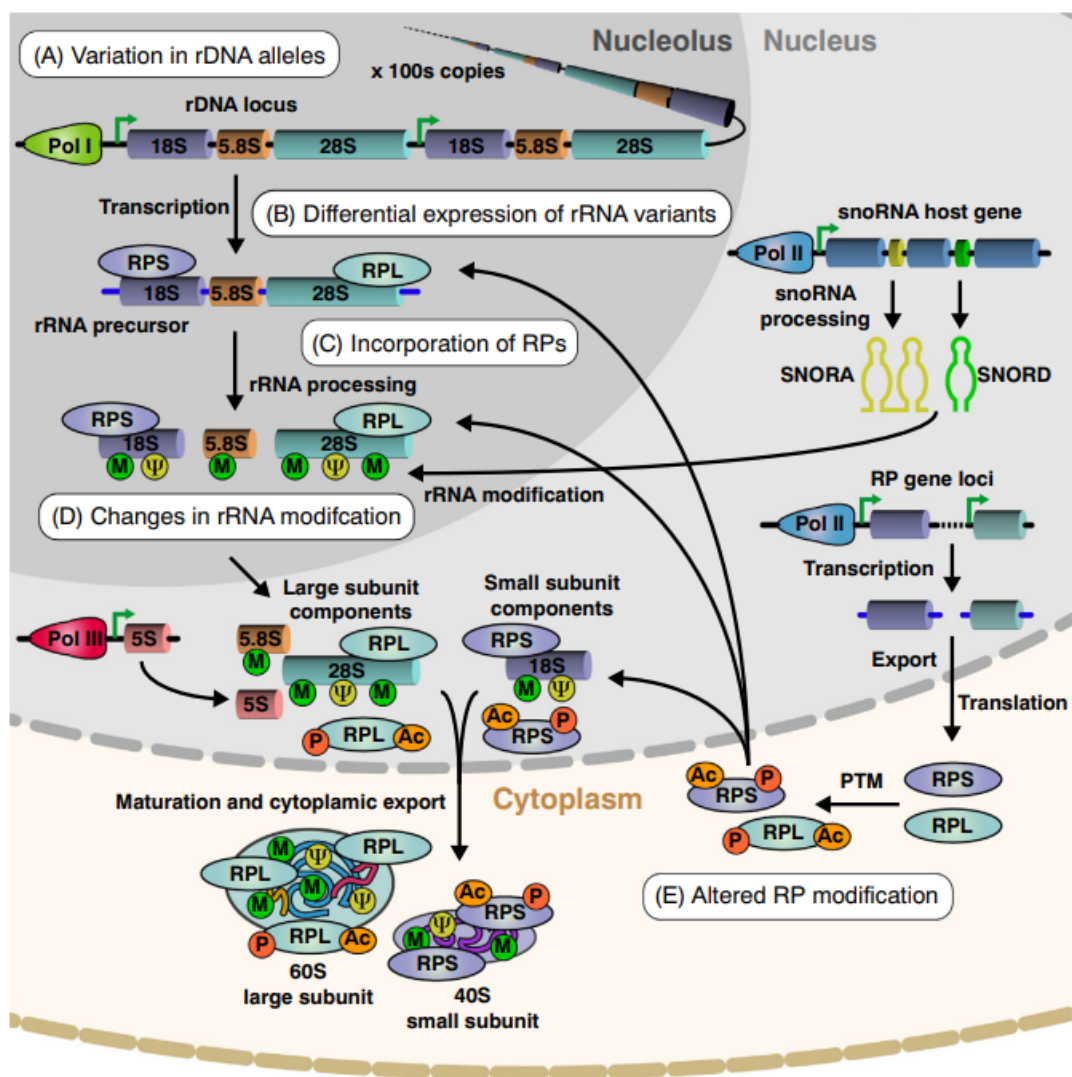


Рис. 21. Схематичная иллюстрация биогенеза рибосом с указанием ключевых этапов, приводящих к возникновению гетерогенности рибосом. Под буквами (A), (B) и (D) обозначены этапы, приводящие к гетерогенности на уровне рРНК: (A) существование повторяющихся локусов рДНК, кодирующих разные варианты рРНК, (B) экспрессия различных вариантов аллелей рДНК и включение их в рибосому, (D) модификации рРНК: 2'-О-метилирование (M) и псевдоуридилирование (Ψ). Под буквами (C) и (E) обозначены этапы, приводящие к гетерогенности рибосом на уровне белков: (C) гетерогенность, вызванная включение в рибосому различных рибосомных белков, (E) посттрансляционные модификации RPs: ацетилирование (Ac) или фосфорилирование (P) [117].

В отличие от дрожжей, для млекопитающих менее характерно присутствие паралогичных белков в рибосомах, тем не менее такие случаи известны. Одним из примеров является RPS4. У человека обнаружено три гена, кодирующих RPS4, один (RPS4X) располагается на X-хромосоме, а два других (RPS4Y1 и RPS4Y2) – на Y-хромосоме. Для паралогов характерна тканеспецифичная экспрессия: в то время как RPS4X экспрессируется повсеместно, RPS4Y1 и RPS4Y2 характерны только для некоторых типов тканей: RPS4Y1 встречается в плаценте, а

RPS4Y2 специфически обнаруживается только в яичках и предстательной железе, где он является компонентом рибосом и, вероятно, участвует в регуляции экспрессии генов [127, 128].

В злокачественных опухолях экспрессия многих RP повышена на уровне мРНК или белка и коррелирует со свойствами опухолевых клеток. Например, сверхэкспрессия RPS3A приводит к злокачественной трансформации клеток NIH-3T3 и росту опухоли у голых мышей [129]. При раке желудка обнаруживается высокая экспрессия RPS13, которую связывают с множественной лекарственной устойчивостью этого заболевания, а также предотвращением индуцированного лекарствами апоптоза и пролиферацией опухолевых клеток [130, 131]. Экспрессия другого рибосомного белка, RPL13, коррелирует с большей пролиферативной способностью и повышенной химиорезистентностью опухолевых клеток [131, 132]. Увеличение экспрессии RPL10 характерно для рака яичников и рака поджелудочной железы и связано с усиленной пролиферацией клеток, инвазией, выживаемостью и устойчивостью к окислительному стрессу [133, 134]. С другой стороны, для некоторых RPs характерно снижение уровней экспрессии в опухолях. Пример тому – белок большой субъединицы рибосомы RPL22. Уровни его экспрессии оказались понижены в немелкоклеточном раке легкого и связаны с канцерогенезом [135]. Кроме того, потеря аллеля RPL22 при остром лимфобластном лейкозе способствует прогрессированию заболевания за счет усиления ангиогенеза [136].

1.3.2. Внерибосомные функции RPs.

У рибосомных белков были обнаружены и многочисленные внерибосомные функции, такие как участие в регуляции клеточной пролиферации и дифференцировки, иммунной сигнализации, репарации ДНК и апоптозе [137].

Сообщалось, что RPs непосредственно участвуют в контроле транскрипцию генов за счет взаимодействия с факторами транскрипции. Например, RPS3 является функциональным компонентом ДНК-связывающих комплексов семейства NF-κB. Он содержит К-гомологичный (KH)-домен, который может связываться со специфическими последовательностями одноцепочечных РНК и ДНК [138]. Также Установлено, что белок RPL11 взаимодействует с с-МЫС – регулятором транскрипции ряда генов, участвующих в делении клеток, метаболической адаптации, выживании клеток и биогенезе рибосом. Это взаимодействие происходит в промоторных областях генов-мишеней с-МЫС, в результате чего происходит ингибирование с-МЫС-зависимой транскрипции [139]. Помимо этого, RPL11 совместно с RPL5 связывают мРНК с-МЫС и направляют ее к RISC-комплексу для деградации [140]. Подобный механизм также был описан для RPS14 [141].

Также было показано, что RPs играют важную роль в регуляции апоптоза. Например, RPS29 усиливал действие противоопухолевых препаратов за счет снижения экспрессии антиапоптотических и повышения уровня проапоптотических белков. RPS3 индуцирует апоптоз, вызванный повреждениями ДНК, принимая участие в активации каспаз 8 и 3 [142]. Кроме того, RPS3 важен для апоптоза, вызванного цитокинами, так как этот белок физически взаимодействует с доменом смерти рецептора фактора некроза опухоли (TNFR) TRADD, что также приводит к индуцированию апоптоза [143]. С другой стороны, раковые клетки со сверхэкспрессией RPL35a демонстрируют более низкие уровни апоптоза и оказываются более устойчивыми к противоопухолевым препаратам [144, 145].

Нарушение экспрессии некоторых RPs может стать причиной злокачественной трансформации клеток. Так моноаллельная потеря RPL22 приводит к опухолевой трансформации предшественников Т-клеток и ускоряет развитие лимфомы тимуса у мышей [146, 147]. В соответствии с этим было обнаружено, что *RPL22* инактивирован в ~10% случаев острого Т-клеточного лимфобластного лейкоза человека [148]. При сверхэкспрессии RPS3a также происходит злокачественная трансформация фибробластов крысы, что подтверждается опытами *in vivo* [149].

1.3.2. Рибосомный белок RPL22L1

Как указывалось ранее, у человека обнаружено всего несколько паралогов рибосомных белков. К сожалению, все они пока что мало изучены, а описания их функций как в норме, так и в патологии крайне обрывочны. Одним из таких белков является RPL22-like1 (RPL22L1). RPL22L1 является паралогом белка большой субъединицы рибосомы RPL22, гомология этих белков составляет 73% (рис. 22) [150]. RPL22 и RPL22L1 высоко консервативны от человека до рыбок данио, и имеют идентичные РНК-связывающие мотивы, но их последовательности расходятся на N конце (рис. 22) [151]

RPL22L1, к 5-фторурацилу, который является основным компонентом терапии при раке простаты [153].

Сообщается о наличии у RPL22L1 вне ribосомных функций, в частности, о его участии в регуляции сплайсинга. Во время эмбриогенеза RPL22 и RPL22L1 были обнаружены в ядре, где они антагонистически контролировали сплайсинг пре-мРНК Smad2, участвующего в передаче сигналов Nodal/TGF- β [154]. При гаструляции Rpl22 связывался с интронными последовательностями пре-мРНК Smad2 и индуцировал пропуск экзона 9, а RPL22L1, напротив, способствовал включению экзона 9 в зрелый транскрипт. Потеря экзона 9, вызванная нокдауном RPL22L1, отрицательно влияла на стабильность укороченного белка Smad2, что в итоге приводило к нарушению процесса гаструляции и вызывало аномалии в строении тела. На основании этих данных, авторы работы предположили, что для нормального протекания эмбриогенеза необходимо соблюдение баланса в функционировании данных белков, который определяется не только уровнями их экспрессии, но и их присутствием в ядре.

Заключение.

Глиобластомы характеризуются высокой внутриопухолевой гетерогенностью, которая отчасти является следствием воздействия микроокружения на опухолевые клетки. Однако в настоящий момент влияние многих компонентов микроокружения на популяции клеток в глиобластомах изучено недостаточно, а конкретные механизмы, описывающие появление разнообразных популяций клеток глиобластомы вовсе неизвестны.

Согласно исследованиям последних лет, большое значение в формировании фенотипа опухолевых клеток имеет регуляция экспрессии генов на уровне трансляции. Неоднократно сообщалось о важной роли ribосомных белков в процессе нормального развития организма или при патологиях. Было показано, что экспрессия генов ribосомных белков отличаются у нормальных и опухолевых тканей. Однако вклад альтернативного сплайсинга РНК в регуляцию функций ribосомных белков также не изучен.

2. ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ РАБОТЫ

Целью настоящей работы стало исследовать влияние альтернативного сплайсинга пре-мРНК рибосомного белка RPL22L1 на протеом и фенотип клеток глиобластомы.

Для достижения поставленной цели были поставлены следующие экспериментальные задачи:

1. Сравнить состав рибосом в клетках из разных зон GBM.
2. Установить механизм, влияющий на состав рибосом.
3. Определить рибосомные белки с наибольшими различиями в сплайсинге их пре-мРНК.
4. Определить функции изоформ рибосомного белка RPL22L1.
5. Изучить регуляцию сплайсинга пре-мРНК RPL22L1.
6. Найти новые низкомолекулярные ингибиторы, нарушающие сплайсинг пре-мРНК RPL22L1.

3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

3.1. Материалы

3.1.1. Важнейшее оборудование

Центрифуги MicroCL 21R (Thermo Fisher) и J2-21 (Beckman); ультрацентрифуга L7-65 (Beckman) и ротор SW-41; термостат MINIB-100 (Miulab); весы электронные Sartorius research и Sartorius excellence (Sartorius); шейкеры Lab-Line ORBIT Environ Shaker (Labsystems automix) и Orbit environ-shaker (LAB-Line instruments); ПЦР-амплификатор ProFlex (Thermo Fisher); спектрофотометр NanoDrop One C (Thermo Fisher); прибор для очистки воды Milli-Q Standart System (Millipore); pH-метр F20-Meter (Mettler Toledo) с электродом InLab Expert Pro-ISM (Mettler Toledo); автоклав pbi autoclave stematic III; камера для электрофореза в агарозном геле Gel Electrophoresis Apparatus GNA-200 (Pharmacia); прибор для капиллярного электрофореза AB 3730 DNA Analyzer (Thermo Fisher); автоматический CO₂-инкубатор (Binder); ламинарный культуральный бокс БМБ-II-Ламинар-С-0,9 (Lamsystems); камера для электрофореза в полиакриламидном геле (Pharmacia); блоки питания EPS 500/400 (Pharmacia), 2301 MacroDrive (LKB Bromma), CPS-6003II (Gophert); камера для блоттинга Mini Blot Module (Thermo Fisher); автоматические пипетки Gilson и Eppendorf; цитометр NovoCyte Flow Cytometer (ACEA biosciences); клеточный сортер FACSAria III (BD Biosciences); конфокальный микроскоп DMIRE2 (Leica); флуоресцентный микроскоп DIAPHOT 300 (Nikon); амплификатор для ПЦР в режиме реального времени Light Cycler96 (Roche); масс-спектрометр Q Exactive HF с хроматографической системой Ultimate 3000 Nano LC System (Thermo Fisher); детектор хемилюминисценции ImageQuant LAS500 (General Electric); секвенатор ДНК нового поколения Illumina HiSeq 2500 (Illumina); счётчик клеток Countess II (Thermo Fisher); планшетный анализатор Fusion α -FP HT Universal Microplate Analyzer (PerkinElmer); холодильники специальные и бытовые, поддерживающие температуру +4 °C, -20 °C, -80 °C; азотное хранилище.

3.1.2. Расходные материалы

Пластиковые наконечники и пробирки для ПЦР (Treff Lab); пластиковые микроцентрифужные пробирки на 0.5, 1.5 мл и 2.0 мл (Eppendorf); одноразовые пипетки на 1, 2, 5, 10 мл (Eppendorf); одноразовые пластиковые пробирки типа Falcon на 15 мл и 50 мл (Corning); 96, 24, 12 и 6 луночные планшеты для клеточных культур; 25 см² и 75 см² матрасы для клеточных культур (Corning); Lab-Tek II Chambered Coverglass (Nunc); слайды для подсчета количества

клеток (Thermo Fisher Scientific); одноразовые чашки Петри (Медполимер); фильтры-воронки на 500 мл с диаметром пор 0,22 мкм (Corning); клеточные фильтры с диаметром пор 40, 70 и 100 мкм (Becton Dickinson); стерилизационные насадки на шприц с диаметром пор 0,22 и 0,45 мкм (Corning).

3.1.3. Основные реактивы и компьютерные программы

Основные материалы, использованные в данной работе, перечислены в Таблице 1.

Таблица 1. Ключевые материалы, использованные в работе.

НАИМЕНОВАНИЕ	ИСТОЧНИК	ИДЕНТИФИКАТОР
Антитела		
anti-ALDH3A2	Abcam	Cat# ab250728
anti-CD109	Santa Cruz Biotechnology	Cat# sc-271085
anti-CD133/2 APC	Miltenyi Biotec	Cat# 130-113-746
anti-CDK5	Abcam	Cat# ab40773
anti-RPN2	Novus Biologicals	Cat# 80836
anti-TP53	Abcam	Cat# 131442
anti-β Actin	Cell Signaling	Cat# 3700
Anti-RPL22L1	Abcam	Cat# ab234792
Anti-RPL22L1	Abcam	Cat# ab188299
Anti-RPL22	Abcam	Cat# ab229458
Anti-SRSF4	Abcam	Cat# ab235606
Anti-Ki67	Abcam	Cat# ab15580
Anti-ALDH1A3	Abcam	Cat# ab129815
Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488	ThermoFisher	Cat# A-11034
Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody, HRP	ThermoFisher	Cat# 31460
Goat anti-Mouse IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, HRP	ThermoFisher	Cat# G-21040
Штаммы бактерий и вирусов		
E. coli BL21 (DE3) Codone + RIL	Agilent	Cat# 230245
E. coli STBL3	ThermoFisher	Cat# C737303
Lentiviruses LVT-TagRFP	Евроген	Cat# LP001
Lentiviruses LVT-TagGFP2	Евроген	Cat# LP004
Основные химические реактивы		
EGF	Sigma	Cat# 0818AFC05
bFGF	Peptotech	Cat# AF-100-18B
MACS NeuroBrew-21 w/o Vitamin A	Miltenyi Biotec	Cat# 130-093-566
DMEM-F12	Sigma	Cat# 56498C
DMEM	ThermoFisher	Cat# 10569010
DMEM, high glucose, no glutamine, no methionine, no cystine	ThermoFisher	Cat# 21013024
DMEM:F-12 для SILAC	ThermoFisher	Cat# 88370

StemPro Accutase Cell Dissociation Reagent	ThermoFisher	Cat# A1110501
Fetal bovine serum	ThermoFisher	Cat# A3160401
Penicillin-Streptomycin	ThermoFisher	Cat# 15140122
N-2 Supplement	ThermoFisher	Cat# 17502-048
Laminin	Sigma	Cat# 11243217001
Temozolomide	Sigma	Cat# 500609
Pladienolide B	SantaCruz Biotechnology	Cat# sc-391691
Lipofectamine LTX and Plus Reagent	ThermoFisher	Cat# 2117479
Opti-MEM	ThermoFisher	Cat#1300232
Protease inhibitor cocktail	Sigma	Cat# P8340
Blotting Grade Blocker Non Fat Dry Milk	Bio-Rad	Cat# 1706404XTU
Maxima H Minis cDNA Synthesis Master Mix	ThermoFisher	Cat# M1661
qPCRMix-HS SYBR	Evrogen	Cat# PK147L
alamarBlue Cell Viability Reagent	ThermoFisher	Cat# DAL1100
HisPur Ni-NTA Magnetic Beads	ThermoFisher	Cat# 88832
Pierce Protein A/G Magnetic Beads	ThermoFisher	Cat# 88802
Actinomycin D	PanReac AppliChem	Cat# A1489
IPTG	Anatrace	Cat# An-I1003
NMDI-14	EMD Millipore	Cat# 530838
Ni-NTA Agarose	Qiagen	Cat# 30210
Ингибитор РНКаз Ribo Lock	ThermoFisher	Cat# EO0384
Fluoroshield with DAPI	Sigma	Cat# F6057
SuperSignal West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate	ThermoFisher	Cat# 34579
Pierce BCA Protein Assay Reagent A	ThermoFisher	Cat# 23223
Pierce BCA Protein Assay Reagent B	ThermoFisher	Cat# 23224
Quick Star Bradford 1x Dye Reagent	Bio-Rad	Cat# 5000205
Циклогексими́д	Abcam	Cat# ab120093
Трипановый синий	ThermoFisher	Cat# T10282
Polybrene	EMD Millipore	Cat# TR-1003-G
Puromycin	Sigma	Cat# P7255
Encyclo Plus PCR kit	Евроген	Cat# PK101
EcoRI	ThermoFisher	Cat# ER0271
Sall	ThermoFisher	Cat# ER0642
BglII	ThermoFisher	Cat# ER0081
BamHI	ThermoFisher	Cat# ER0051
NcoI	ThermoFisher	Cat# ER0571
NheI	ThermoFisher	Cat# ER0975
RNase-free DNase Set	Qiagen	Cat# 79254
T4 DNA Ligase	ThermoFisher	Cat# EL0011
FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase	ThermoFisher	Cat# EF0651
Lympholyte-H	Cedarlane Laboratories	Cat# CL5015
раствор Трипсина-Версена	Promega	Cat#V5111
QIAzol Lysis Reagent	Qiagen	Cat# 79306
DakoCytomation target retrieval solution pH 6	Dako	Cat# S1700
Serum-free protein block solution	Dako	Cat# X0909
Коктейль ингибиторов фосфатаз 1	Sigma	P2850
Коктейль ингибиторов фосфатаз 2	Sigma	P5726
Tissue-Tek O.C.T. Compound	Sakura Finetek	Cat# 4583

Коммерческие наборы		
ZymoPURE Plasmid Miniprep Kit	Zymo Research	Cat# D4210
DNA Clean & Concentrator-5	Zymo Research	Cat# D4014
HiSpeed Plasmid Midi Kit	Qiagen	Cat# 12643
DNeasy Blood & Tissue Kit	Qiagen	Cat# 69504
Pierce SILAC Protein Quantitation Kit (Trypsin)	ThermoFisher	Cat# A33972
RNeasy mini kit	Qiagen	Cat# 74104
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen	Cat# 28704
Magna RIP RNA-Binding Protein Immunoprecipitation Kit	EMD Millipore	Cat# 17-700
CellEvent Caspase-3/7 Green Flow Cytometry Assay Kit	ThermoFisher	Cat# C10427
Click-iT HPG Alexa Fluor 488 Protein Synthesis Assay Kit	ThermoFisher	Cat# C10428
LookOut Mycoplasma PCR Detection Kit	Sigma	Cat# MP0035-1KT
Quick Start Bradford Protein Assay Kit 1	Bio-Rad	Cat# 5000201
Pierce BCA Protein Assay Kit	ThermoFisher	Cat# 23227
EnVision+ System–HRP labeled Polymer	Dako	Cat# K4003
DAB peroxidase substrate kit	Vector Laboratories	Cat# SK-4100
High-Select TiO ₂ Phosphopeptide Enrichment Kit	Thermo Fisher	Cat# A32993
Клеточные линии		
GBM001	Получены в этой работе	См. Таблицу 2
GBM006	Получены в этой работе	См. Таблицу 2
GBM007	Получены в этой работе	См. Таблицу 2
GBM010	Получены в этой работе	См. Таблицу 2
GBM020	Получены в этой работе	См. Таблицу 2
GBM022	Получены в этой работе	См. Таблицу 2
GBM025	Получены в этой работе	См. Таблицу 2
GBM083	Получены ранее в нашей лаборатории	См. Таблицу 2
GBM157	Получены ранее в нашей лаборатории	См. Таблицу 2
GBM267	Получены ранее в нашей лаборатории	См. Таблицу 2
GBM1051	Получены ранее в нашей лаборатории	См. Таблицу 2
GBM1079	Получены ранее в нашей лаборатории	См. Таблицу 2
U87MG	ATCC	Cat# HTB-14
A549	ATCC	Cat# CCL-185
DU145	ATCC	Cat# HTB-81
HepG2	ATCC	Cat# HB-8065
RD	ATCC	Cat# CCL-136

Phoenix-GP	ATCC	Cat# CRL-3215
Normal Human Astrocytes (NHA)	ThermoFisher	Cat# N7805100
Модельные животные		
Мыши NOD SCID (<i>Prkdcscid</i>)	The Jackson Laboratory	Cat# 001303
Олигонуклеотиды		
Праймеры для RT-PCR	Евроген	N/A
Праймеры для клонирования	Евроген	N/A
shRNA SRSF4 (sh48)	Sigma-Aldrich	TRCN0000231448
shRNA SRSF4 (sh49)	Sigma-Aldrich	TRCN0000231449
Плазмидные векторы		
pCDH□EF1□MCS□IRES□Puro	System Biosciences	Cat# CD532A-2
pCDH-Fc-RPL2211a	Получены в этой работе	N/A
pCDH-Fc-RPL2211b	Получены в этой работе	N/A
pCDH-RPL2211a	Получены в этой работе	N/A
pCDH-RPL2211b	Получены в этой работе	N/A
pTagRFP-C	Евроген	Cat# FP141
pTagRFP-SRSF1	Получены в этой работе	N/A
pTagRFP-SRSF2	Получены в этой работе	N/A
pTagRFP-SRSF3	Получены в этой работе	N/A
pTagRFP-SRSF4	Получены в этой работе	N/A
psPAX2	Addgene	Cat# 12260
pMD2.G	Addgene	Cat# 12259
pET28a+	Addgene	Cat# 69864-3
pET28-RPL22L1a	Получены в этой работе	N/A
pET28-RPL22L1b	Получены в этой работе	N/A
pKAN-T	Евроген	Cat# TA003
Основные компьютерные программы		
STRING	https://string-db.org/	N/A
X! Tandem	http://www.thegpm.org/tandem/	N/A
MASCOT		N/A
Scaffold 4	Proteome Software	N/A
STAR		N/A
MSConvert	ProteoWizard Software Foundation	N/A
MaxQuant	https://www.maxquant.org/	N/A
ProteinPilot		N/A

Trimmomatic	http://www.usadella.com/b.org/cms/	N/A
Salmon		N/A
PhyloP	https://genome.ucsc.edu/index.html	N/A
UCSC Genome browser	https://genome.ucsc.edu/index.html	N/A
Prism 6	https://www.graphpad.com/support/prism-6-updates/	N/A

3.1.4. Олигодезоксирибонуклеотиды

Олигонуклеотиды, использованные в данной работе, были синтезированы фирмой Evrogen. Последовательности олигонуклеотидов представлены в Таблице 1 Приложения.

3.1.5. Буферные растворы

Буфер TBE: 89 мМ Трис-НСl, 89 мМ борная кислота, 2 мМ Na₂EDTA.

Буфер PBS: 8,06 мМ Na₂HPO₄, 1,47 мМ KH₂PO₄ pH 7.4, 137 мМ NaCl, 2,68 мМ KCl

Буфер TBST: 50 мМ Трис-НСl pH 7.6: 150 мМ NaCl, 0,1% Твин-20.

Буфер PBST: PBS с 0,1% Твин-20.

Буфер для подавления неспецифической сорбции: 5% Blotting Grade Non Fat Dry Milk в TBST.

Буфер для переноса 1: 25 мМ Трис, 192 мМ глицин, 20% этанол.

Буфер для переноса 2: 25 мМ Трис, 192 мМ глицин, 20% этанол, 0,1% SDS.

Буфер для нанесения образца на агарозный гель (6x): 10% бромфеноловый синий, 10% ксиленцианол, 30% глицерин.

Буфер 4xSLB: 800 мМ Трис-НСl pH 8.5, 8% LDS, 30% глицерин, 2 мМ EDTA, 0.8 мМ SERVA Blue G, 0.7 мМ Феноловый красный, перед использованием добавить 5%-β меркаптоэтанола

Буфер для электрофореза по Лэммли: 25 мМ Трис-НСl pH 8.3, 1% SDS, 192 мМ глицин.

Буфер TBE: 45 мМ Трис-НСl, 45 мМ H₃BO₄, 0,034% ЭДТА-Na

Буфер В: 100 мМ NaH₂PO₄, 10 мМ Трис-НСl pH 8.0, 150 мМ NaCl, 8 М мочевины

Буфер С: Буфер В с pH 6.3

Буфер для элюции белка: Буфер С с 250 мМ имидазол pH 6.3

Буфер D: 20 мМ Tris pH 7,5, 150 мМ KCl, 10 мМ имидазола, 0,5 мМ DTT, 0,5 % NP40, 0,1% дезоксихолата натрия, коктейль ингибиторов протеаз.

Буфер E: 20 мМ Tris pH 7.5, 150 мМ KCl, 10 мМ имидазол, 0.5 мМ DTT, 0,5 % NP40, 0.1% SDS, коктейль ингибиторов протеаз

Буфер для фиксации клеток: 4% параформальдегид в PBS (pH 7,2)

Пермеабилизирующий буфер: 0,25% TritonX-100 в PBS.

Лизирующий буфер E для выделения полисом: 20 mM Трис-НСl, pH 7,5, 250 mM NaCl, 1,5 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0,5% Triton X100, 100 мкг/мл циклогексимида (Abcam), 20 Ед/мл ДНКазы I (Qiagen).

Лизирующий буфер F для белковой иммунопреципитации: 20 mM Tris pH 7,5, 150 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 0,5 mM DTT, 0,5 % NP-40, 0,1% дезоксихолат натрия, коктейль ингибиторов протеаз.

Элюирующий буфер G для белковой иммунопреципитации: 8 M мочевины, 2 M тиомочевина, 10 mM Трис-НСl, pH 8.

Буфер для лизиса H: 100 mM Tris-НСl, pH 8.0, 4% SDS, коктейль ингибиторов фосфатаз 1 и 2 (Sigma)

Буфер CC: 10 mM PIPES, 15 mM CaCl₂, 55 mM MnCl₂·4H₂O, 250 mM KCl, pH 6.7

3.1.6. Микробиологические среды [155].

Среда LB: 10 г NaCl, 10 г триптона, 5 г дрожжевого экстракта на 1 л воды Milli-Q с добавкой различных антибиотиков.

Агаризованная среда LB: 1,5% раствор агара в среде LB с добавкой различных антибиотиков.

Среда SOB: 2% Триптон (w/v), 0,5% дрожжевой экстракт (w/v), 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂·6H₂O, 10 mM MgSO₄.

3.1.7. Среда для культивирования эукариотических клеток [155].

Среда I: Opti-MEM (ThermoFisher);

Среда II: DMEM, 10% FBS, 2мM глутамин, пеницилин (100 ед/мл), стрептомицин (100 мкг/мл)

Среда III: DMEM/F12, 10% FBS, 1мM пируват-Na, 2мM глутамин, пеницилин (100 ед/мл), стрептомицин (100 мкг/мл)

Среда IV: DMEM/F12, 2% B27, 2мM глутамин, 20 нг/мл EGF, 20 нг/мл bFGF, пеницилин (100 ед/мл), стрептомицин (100 мкг/мл)

Среда V: DMEM/F12, 10% FBS, 2% B27, 2мM глутамин, пеницилин (100 ед/мл), стрептомицин (100 мкг/мл)

Среда для криоконсервации клеток: 90% FBS и 10% DMSO.

3.2. Методы.

3.2.1. Методы работы с ДНК.

3.2.1.1. Рестрикция ДНК [155].

Для проведения рестрикции к 500-1000 нг. ДНК, добавляли 1 мкл соответствующего концентрированного буфера для эндонуклеаз рестрикции и 0.5 мкл каждого фермента. Объем смеси доводили водой Milli-Q до 10 мкл. После внесения всех компонентов в микропробирку смесь перемешивали и инкубировали при 37 °С в термостате в течение 2 часов.

3.2.1.2. Дефосфорилирование концов ДНК [155].

К раствору вектора после рестрикции добавляли 1 мкл фосфотазы FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase и инкубировали при 37 °С в термостате в течение 40 минут. После дефосфорилирования ДНК выделяли из геля набором QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) или из раствора с помощью набора DNA Clean & Concentrator-5 (Zymo Research) в соответствии с инструкцией производителей.

3.2.1.3. Лигирование ДНК [155].

Смесь для лигирования содержала следующие компоненты: аликвоты растворов вектора и «вставки», 2 мкл 10x буфера для T4 ДНК лигазы и 1 мкл T4 ДНК лигазы. Объем смеси доводили водой Milli-Q до 20 мкл. После перемешивания смесь инкубировали при +12 °С в течение ночи.

3.2.1.4. Выделение плазмидной ДНК из бактерий [155].

Для большинства экспериментов плазмидную ДНК выделяли из бактерий E. Coli штамма Stb13 с помощью фирменного набора ZymoPure Plasmid Miniprep Kit (Zymo Research) по инструкции производителя.

Для получения лентивирусных частиц плазмидную ДНК выделяли из бактерий E. coli штамма Stb13 с помощью фирменного набора HiSpeed Plasmid MidiKit (QIAGEN) по инструкции производителя.

3.2.1.5. Амплификация фрагментов ДНК методом полимеразной цепной реакции [155].

Для проведения полимеразной цепной реакции в микропробирках объемом 500 мкл или 200 мкл смешивали по 10 пМ «прямого» и «обратного» праймеров, 2 мкл 10x буфера для ПЦР, 1

мкл 2,5 мМ раствора дезоксирибонуклеотидтрифосфатов, 0.2 мкл ДНК-полимеразы, добавляли ДНК, используемую в качестве матрицы для синтеза, и доводили объем реакционной смеси до 20 мкл водой Milli-Q.

При проведении большинства реакций использовали следующий температурный режим:

- 1) 95°C – 2'30"
 - 2) 95°C – 30" (денатурация)
 - 3) 55-66°C – 30" (отжиг праймеров)
 - 4) 72°C – 30" - 2' (элонгация)
 - 5) 72°C – 7'
- } 25-35 циклов

Для каждой пары праймеров использовали вычисленную с помощью компьютерной программы “PrimerBlast” оптимальную температуру отжига. Время элонгации устанавливалось из расчёта, что на синтез участка ДНК длиной 1000-1500 нуклеотидов требуется 1 минута элонгации. Количество циклов устанавливалось эмпирически.

Для проведения ПЦР в реальном времени (qRT-PCR) использовали смесь qPCRmix-HS SYBR (Евроген). На одну реакцию брали 4 мкл смеси qPCRmix-HS SYBR, 1-2 мкл кДНК, по 0,5 мкл 10 мкМ праймеров, объем реакции доводили до 20 мкл водой Milli-Q. Реакцию проводили в амплификаторе Light Cycler96 (Roche). Условия амплификации:

- 1) 95°C – 2,5 мин
 - 2) 95°C – 20 сек (денатурация)
 - 3) 60°C – 20 сек (отжиг праймеров)
 - 4) 72°C – 20 сек (элонгация)
 - 5) 72°C – 7'
- } 45 циклов

Детекция флуоресценции проводилась после каждого этапа элонгации ($\lambda_{EX}=470$ нм и $\lambda_{EM}=514$ нм).

Данные анализировались с помощью программного обеспечения LightCycler 96 software (Roche). Также анализировали кривые плавления и ставили электрофорез для подтверждения специфичности амплификации. Относительный уровень продукта реакции определяли методом $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Для определения относительных количеств анализируемых транскриптов проводили нормализацию с использованием референсных генов: GAPDH и 18S. Все эксперименты qRT-PCR проводили в трех повторах.

3.2.1.6. Очистка ПЦР-продукта.

Очистка продукта ПЦР проводилась с помощью набора DNA Clean & Concentrator-5 (Zymo Research) по инструкции производителя.

3.2.1.7. Электрофорез ДНК [155].

Электрофорез ДНК проводили в 1,5-2% агарозном геле в буфере TBE с добавкой бромистого этидия (0,1 мкг/мл) при напряжении 300 В и силе тока 200 мА.

3.2.1.8. Выделение ДНК из геля [155].

Полученные после рестрикции фрагменты ДНК разделяли электрофорезом в агарозном геле, содержащем бромистый этидий. Нужный фрагмент ДНК, визуализированный с помощью трансиллюминатора, быстро вырезали стерильным скальпелем. Очистку ДНК из вырезанного фрагмента геля проводили с использованием фирменного набора QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) по инструкции производителя.

3.2.1.9. Секвенирование плазмидной ДНК.

Секвенирование плазмидной ДНК проводилось по методике Сенгера компанией Евроген.

3.2.1.10. Создание плазмидных векторов.

Фрагменты ДНК, кодирующие изоформы RPL22L1, амплифицировали с кДНК методом ПЦР с использованием пары праймеров BglII-RPL22L1/RPL22L1-SalI и клонировали в сайты BamHI/SalI вектора pET28a+ (Addgene). Было проведено секвенирование по Сэнгеру плазмид, очищенных от 12 бактериальных колоний. Все последовательности полностью соответствовали нашим данным RNAseq и выявили присутствие только 2 изоформ RPL22L1. Полученные плазмиды были названы pET28-RPL22L1a и pET28-RPL22L1b соответственно. Затем фрагменты ДНК, кодирующие RPL22L1a и RPL22L1b, амплифицировали с плазмид pET28-RPL22L1a и pET28-RPL22L1b методом ПЦР с использованием пары праймеров EcoRI-RPL22L1/RPL22L1-BamHI и клонировали в сайты EcoRI/BamHI вектора pCDH-EF1-MCS-IRES-Puro (System Biosciences) для получения плазмид pCDH-RPL22L1a и pCDH-RPL22L1b. Фрагмент ДНК, кодирующий Fc-фрагмент, амплифицировали ПЦР с вектора pFUSE-hIgG1-Fc1 (InvivoGen) с использованием пары праймеров NheI-ATG-Fc/Fc-GS-EcoRI и клонировали в сайты NheI/EcoRI плазмид pCDH-RPL22L1a или pCDH-RPL22L1b для получения плазмид pCDH-Fc-RPL22L1a или pCDH-Fc-RPL22L1b соответственно. Фрагменты ДНК, кодирующие SRSF1, SRSF2, SRSF3 и SRSF4, амплифицировали с кДНК методом ПЦР с использованием пар праймеров

EcoRISRSF1/SRSF1-SalI, EcoRI-SRSF2/SRSF2-BamHI, EcoRI-SRSF3/SRSF2-SalI и EcoRISRSF4/SRSF4-SalI соответственно. Полученные ДНК клонировали в сайты EcoRI/SalI или EcoRI/BamHI (для SRSF2) вектора pTagRFP-C (Evrogen) для получения плазмид pTagRFP-SRSF1, pTagRFP-SRSF2, pTagRFP-SRSF3 и pTagRFP-SRSF4. Фрагмент ДНК, кодирующий SRSF4, амплифицировали с плазмиды pTagRFP-SRSF4 методом ПЦР с использованием пары праймеров EcoRI-SRSF4(2)/SRSF4-BamHI(2) и клонировали в сайты EcoRI/BamHI плазмиды pCDH-Fc-RPL22L1a для получения плазмид pCDH-Fc-SRSF4. Фрагмент ПЦР RPL22L1, амплифицированный с кДНК клеток, обработанных FG1059, очищали с помощью набора для выделения из геля QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) в соответствии с инструкцией производителя и лигировали в вектор pKAN-T (Evrogen) для получения плазмиды pKAN-T-RPL22L1, которую использовали для секвенирования по Сэнгеру. Во всех случаях отсутствие нежелательных мутаций во вставках и на границах вектор-вставка было подтверждено секвенированием.

3.2.2. Методы работы с РНК.

3.2.2.1. Выделение РНК и получение кДНК.

Выделение РНК проводили с использованием набора RNeasy Mini Kit (Qiagen) согласно инструкции производителя. Для выделения РНК из клеток после сортировки использовали реагент QIAzol (Qiagen). Процедура проводилась по инструкции производителя.

Обратная транскрипция проводилась с помощью набора Maxima H Minus cDNA Synthesis Master Mix (Thermo Fisher) по инструкции производителя. В реакционную смесь добавляли 4 мкл указанной смеси, 400-2000 нг РНК, объем доводили водой MilliQ до 20 мкл..

3.2.2.2. РНК-иммунопреципитация (RIP) [155].

Молекулы РНК, взаимодействующие с белками RPL22L1a, RPL22L1b и SRSF4, выделялись из клеток GBM157, стабильно экспрессирующих Fc-RPL22L1a, Fc-RPL22L1b и Fc-SRSF4, с помощью антител к Fc-фрагменту и набора “Magna RIP RNA-Binding Protein Immunoprecipitation Kit” по инструкции производителя. Выделенная РНК использовалась для секвенирования последнего поколения или проведения ПЦР в реальном времени (qRT-PCR).

3.2.2.3. Секвенирование РНК

Для наибольшей точности анализа изменений в сплайсинге пре-мРНК в данной работе использовалось “125bp paired-end” секвенирование. Библиотеки кДНК для секвенирования с парными концами были приготовлены с помощью набора “TruSeq Stranded mRNA-Seq” по инструкции производителя. Полученные образцы были отсеквенированы на приборе “Illumina HiSeq 2500”.

3.2.2.4. Анализ стабильности РНК

Для анализа скорости деградации днРНК MALAT1 нейросферы GBM инкубировали с 10 мкг/мл актиномицина D (PanReac AppliChem) в течение 0, 3, 6 и 9 часов. В указанные промежутки времени из клеток выделяли РНК с помощью RNeasy Mini Kit (Qiagen) в соответствии с инструкцией производителя. Выделенные РНК анализировали с помощью qRT-PCR.

3.2.2.5. Определение концентрации нуклеиновых кислот.

Концентрации полученных ДНК и РНК определялись с помощью спектрофотометра NanoDrop One C.

3.2.3. Методы работы с бактериями.

3.2.3.1. Приготовление химически компетентных клеток *E.coli*.

Одиночную бактериальную колонию *E. Coli* Stbl3 переносили в пробирку на 50 мл, содержащую 20 мл среды SOB со стрептомицином, и инкубировали ночь при 37°C с постоянным перемешиванием со скоростью 220 rpm. Далее культуру переносили в 800 мл среды SOB со стрептомицином. Колбу инкубировали при 18 – 22°C при постоянном перемешивании до достижения оптической плотности 0,6-0,7 при длине волны 600 нм. Далее колбу с суспензией охлаждали на льду в течение 10 мин. Затем суспензию центрифугировали 10 мин 6000 rpm 4°C. Клетки ресуспендировали в 80 мл предварительно охлажденного буфера CC (10 mM PIPES, 15 mM CaCl₂, 55 mM MnCl₂·4H₂O, 250 mM KCl, pH 6.7). Ресуспендирование проводили осторожным перемешиванием во льду. Далее снова центрифугировали 10 мин, 4000 rpm, 4°C. С помощью вакуумного аспиратора удаляли капли оставшейся среды, прилипшие к стенкам пробирки или попавшие в ее горлышко.

Осадок клеток ресуспендировали в 18,6 мл ледяного буфера CC (10 mM PIPES, 15 mM CaCl₂, 55 mM MnCl₂·4H₂O, 250 mM KCl, pH 6.7). Добавляли 1,4 мл DMSO, перемешивали

бактериальную суспензию и инкубировали ее во льду в течение 10 мин. Далее разливали аликвоты (100 мкл) в стерильные пробирки объемом 1,5 мл. Пробирки замораживали в жидком азоте и хранили при температуре -80°C.

3.2.3.2. Химическая трансформация клеток *E.coli* [155].

Для трансформации аликвоту компетентных клеток, хранящихся при -80°C, размораживали во льду и добавляли к бактериям 7 мкл раствора ДНК в воде Milli-Q. Смесь перемешивали и инкубировали во льду 30 минут. Далее клетки инкубировали при 42 °C 40 секунд, далее перемещали в лед на 5 минут. К суспензии бактерий добавляли 750 мкл заранее подогретой до 37°C среды LB без антибиотика и инкубировали при 37°C в течение 45 минут. После этого проводили посев клеток (50-400 мкл) на агаризованную среду LB с соответствующим антибиотиком и инкубировали в течение 18 часов при 37°C.

3.2.3.3. ПЦР скрининг колоний, выросших на агаризованной среде [155].

Для обнаружения бактериальных колоний, содержащих целевую плазмиду, использовался метод ПЦР-скрининга. Для этого часть бактерий из колонии, выросшей на чашке Петри с агаризованной средой, переносили микробиологической петлёй в пробирку для ПЦР, содержащую 10 мкл воды Milli-Q. Затем в пробирку добавляли 10 мкл смеси, состоящей из 1 мкл 2.5 mM dNTP, 10 пМ «прямого» и «обратного» праймеров, 2 мкл 10x буфера для ПЦР, 0.1 мкл Taq-полимеразы и воды Milli-Q. Далее проводили 30 циклов ПЦР с температурным режимом, описанным выше. ПЦР-продукты анализировали электрофорезом в 1,5% агарозном геле. По наличию ДНК соответствующей молекулярной массы определяли колонии, содержащие необходимую плазмиду.

3.2.3.4. Индукция синтеза рекомбинантных белков в бактериях *E.coli* [155].

Клетки из индивидуальных колоний бактерий *E.coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL, трансформированные плазмидой, кодирующей целевой белок, переносили микробиологической петлёй с агаризованной среды в 17 мл среды LB с необходимым антибиотиком и инкубировали ночь на шейкере при 37°C. На следующий день, среду с бактериями переливали в колбу объемом 750 мл, содержащую 200 мл свежей среды LB с антибиотиком. Ёмкость с клетками инкубировалась на шейкере при 37°C до достижения оптической плотности среды 0,7 при $\lambda = 600$ нм. После этого для индукции транскрипции в среду с бактериями добавляли изопропил-b-D-тиогалактозид (IPTG) до конечной концентрации 1 mM и инкубировали биомассу еще 4 часа на шейкере при температуре 37°C.

3.2.3.5. Консервация штаммов *E.coli* [155].

Для консервации штаммов *E.coli* бактерии из индивидуальных колоний с агаризованной среды LB переносили микробиологической петлёй в 4 мл жидкой среды LB с антибиотиком и инкубировали ночь на шейкере при 37°C. Утром 850 мкл полученной биомассы переносили в микропробирку, добавляли к ней 150 мкл глицерина и замораживали при температуре -80°C.

3.2.4. Методы работы с белками.

3.2.4.1. Выделение белков, содержащих гексагистидиновый участок, в денатурирующих условиях из бактерий *E.coli* [155].

После индукции трансляции 200 мл среды с бактериями центрифугировали (15 мин, 4000 об/мин, 4°C, ротор JS-7,5 Beckman), супернатант сливали, осадок ресуспендировали в 12 мл лизирующего буфера В (100 мМ NaH₂PO₄, 10 мМ Трис-НСl pH 8.0, 150 мМ NaCl, 8 М мочевины) и оставляли на 1,5 часа при комнатной температуре, периодически перемешивая. Полученный лизат центрифугировали (15 мин, 15000 об/мин, 4°C, ротор JS-20 Beckman). Супернатант переносили в чистую пробирку, добавляли к нему 2 мл Ni-NTA агарозы и инкубировали при постоянном перемешивании при комнатной температуре в течение 1 часа. Полученную суспензию переносили на колонку. После оседания Ni-NTA агарозы осадок промывали, пропуская через колонку 20 мл буфера В (100 мМ NaH₂PO₄, 10 мМ Трис-НСl pH 8.0, 150 мМ NaCl, 8 М мочевины) и 20 мл буфера С (Буфер В с pH 6.3). Затем на колонку медленно наносили 2 мл элюирующего буфера (буфер С с 250 мМ имидазол pH 6.3) и после 10 минут инкубации при комнатной температуре собирали элюат с колонки. Полученный раствор помещали в диализный мешок и диализовали в течение ночи против PBS с добавлением 1 мМ DTT.

3.2.4.2. Денатурирующий электрофорез в ПААГ по Лэммли [155].

Для электрофореза использовали трис-глициновые гели Novex WedgeWell 4-20% (ThermoFisher). В камеру для электрофореза сверху и снизу заливали буфер для электрофореза по Лэммли. Образцы белков смешивали с буфером 4xSLB в соотношении 1:3 и прогревали при 95°C в течение 2 минут. Полученный раствор наносили в лунки геля по 10-40 мкл в лунку. Электрофорез проводили при постоянном напряжении 25В (на стадии концентрирования) и 250 В (на стадии разделения). Окрашивание геля проводили с помощью Coomassie brilliant blue R250.

3.2.4.3. Иммуноблоттинг [155].

Клетки лизировали в течение 30 мин на льду в буфере RIPA, содержащего 1% коктейля ингибиторов протеаз (Sigma). Далее лизаты центрифугировали при 20000g, 15 мин, 4°C. Концентрацию белка определяли с помощью метода BCA [156]. Лизаты наносились на градиентный трис-глициновый гель Novex WedgeWell 4-20% (ThermoFisher) в количестве 10-30 мкг суммарного белка на лунку. После электрофоретического разделения белков в блок для Вестерн-блоттинга (ThermoFisher) последовательно выкладывали вымоченный в буфере для переноса лист фильтровальной бумаги, мембрану, предварительно смоченную в 96% этаноле в течение 5 минут, полиакриламидный гель и снова лист фильтровальной бумаги. Для экспериментов по детекции изоформ RPL22L1 использовали буфер для переноса 1 (25 mM Трис, 192 mM глицин, 20% этанол), во всех остальных случаях – буфер для переноса 2 (25 mM Трис, 192 mM глицин, 20% этанол, 0,1% SDS.) Далее проводили перенос при постоянном напряжении 20 В в течение 20-60 минут. После переноса мембрану инкубировали в буфере для подавления неспецифической сорбции (5% Blotting Grade Non Fat Dry Milk в TBST) в течение 1 часа при комнатной температуре и умеренном перемешивании. Далее мембрану инкубировали с раствором первичных антител в буфере TBST в течение ночи на шейкере при температуре +4°C. На следующий день мембрану промывали 3 раза по 10 минут TBST и помещали в раствор вторичных антител, конъюгированных с пероксидазой, в буфере для подавления неспецифической сорбции. Мембрану инкубировали в течение ещё 1 часа при комнатной температуре на шейкере, после чего снова промыли 4 раза по 10 минут буфером TBST.

3.2.4.4. Проявление мембраны после иммуноблоттинга.

Проявление мембраны осуществлялось с помощью наборов Super Signal West Pico PLUS Chemiluminiscent Substrate (Thermo Fisher) или Super Signal West Femto PLUS Maximum Sensivity Substrate (Thermo Fisher) согласно инструкции производителя. Хемилюминисценцию детектировали с помощью имеджера ImageQuant LAS500 (General Electric).

3.2.4.5. Исследование взаимодействия рекомбинантных белков *in vitro* методом «пулл-дауна» с помощью Protein-A/G магнитных частиц [155].

Клетки GBM, оверэкспрессирующие Fc-RPL22L1a, Fc-RPL22L1b или Fc-меченый контрольный белок, инкубировали на льду в течение 30 мин с 600 мкл лизирующего буфера F (20 mM Tris pH 7,5, 150 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 0,5 mM DTT, 0,5 % NP-40, 0,1% дезоксихолат натрия, коктейль ингибиторов протеаз) и затем центрифугировали в течение 15 мин, 20000 g при 4°C. Очищенный таким образом лизат использовали для дальнейшей иммунопреципитации. Для получения белковых комплексов, 50 мкл магнитных частиц Pierce Protein A/G Magnetic Beads

(Thermo Fisher) инкубировали с лизатом клеток GBM в течение 1 ч при комнатной температуре и постоянном перемешивании. Далее магнитные частицы промывали один раз 0,3 мл лизирующего буфера F (20 mM Tris pH 7,5, 150 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 0,5 mM DTT, 0,5 % NP40, 0,1% дезоксихолат натрия, коктейль ингибиторов протеаз) и 3 раза 0,5 мл PBS. Связанные белки элюировали буфером G (8 M мочевины, 2 M тиомочевина, 10 mM Трис-HCl, pH 8.) и использовали для последующего LC-MS/MS анализа.

3.2.4.6. *Исследование белок-белковых взаимодействий in vitro методом преципитации белков из клеточных лизатов с помощью Ni-NTA магнитных частиц [155].*

Растворы рекомбинантных His-меченых изоформ RPL22L1 инкубировали с 30 мкл магнитных частиц HisPur Ni-NTA Magnetic Beads (ThermoFisher) в течение 1 часа. Далее магнитные частицы промывали 3 раза 1 мл буфера PBS. Полученные магнитные частицы с иммобилизованным на них белком использовались для исследования белок-белковых взаимодействий. Клетки GBM, культивируемые на 75см² матрасе, промывали холодным PBS. Далее клетки лизировали в 2 мл буфера E (20 mM Tris pH 7.5, 150 mM KCl, 10 mM имидазол, 0.5 mM DTT, 0,5 % NP40, 0.1% SDS, коктейль ингибиторов протеаз) на льду в течение 30 минут. Лизат центрифугировали 15 минут 20000g, 4°C и добавляли к 30 мкл магнитных частиц HisPur Ni-NTA Magnetic Beads (ThermoFisher) с иммобилизованным на них рекомбинантным белком. Далее суспензию инкубировали при постоянном перемешивании при комнатной температуре в течение одного часа. После этого пробирки со смесью помещали в магнитную подставку, отбирали супернатант и промывали магнитные частицы один раз 1 мл буфера E и ещё три раза 0,5 мл PBS. Связавшиеся белки элюировали 30 мкл раствора 300 mM имидазола в PBS и использовали для LC-MS/MS анализа.

3.2.4.7. *SILAC [155].*

Для эксперимента использовались наборы SILAC Protein Quantitation Kit (Trypsin). Вместо DMEM использовали DMEM/F12 для SILAC (Thermo Fisher) с добавлением 2% Macs NeuroBrew-21 (Miltenyi Biotec, 20 нг/мл EGF (Sigma), 20 нг/мл bFGF (Sigma)). Клетки выращивали на среде с контрольными или изотопно-мечеными Лизином (конечная концентрация 100 мг/л; меченый ¹³C₆ L-Лизин-2HCl) и Аргинином (конечная концентрация 200 мг/л; меченый ¹³C₆ и ¹⁵N₄ L-Аргинин HCl). Клетки культивировались на меченой и немеченой средах параллельно в течение более 10 пассажей и более 50 дней, чтобы добиться более чем 98% частоты включения метки.

3.2.4.8. Подготовка образцов для фосфопротеомного анализа.

Для обогащения фосфорилированных пептидов мы использовали метод МОАС на колонках с TiO_2 с помощью набора High-Select TiO_2 Phosphopeptide Enrichment Kit (Thermo Fisher) в соответствии с протоколом производителя. Для этого в день перед экспериментом к первичным культурам GBM добавляли 3 мкМ FG1059 и спустя 2, 6 и 12 часов отбирали $10 \cdot 10^6$ клеток, три раза промывали PBS, центрифугировали 150g, 5 мин. Далее образцы ресуспендировали в буфере для лизиса Н (50 мМ Tris-HCl, pH 8.0, 4% SDS, коктейли ингибиторов фосфатаз 1 и 2 (Sigma)). и инкубировали в течение 30 минут при 60°C на термошейкере. Затем дезинтегрировали ультразвуковым гомогенизатором (по 3 ультразвуковых сигнала на каждый образец). Полученные лизаты центрифугировали при 16 000 g в течение 10 мин при 4°C для удаления клеточного дебриса.

Далее проводили восстановление и стабилизацию дисульфидных связей в образцах: сначала восстанавливали S-S связи с помощью DTT (конечная концентрация - 5 мМ) в течение 30 мин при 50°C и затем алкилировали йодацетамидом (конечная концентрация - 10 мМ) в течение 20 мин при комнатной температуре. Затем белки осаждали метанол-хлороформным методом [157] и полученный осадок сушили в скоростном вакуумном концентраторе в течение 2 минут.

Далее пробы подвергали трипсинолизу: добавляли трипсин в массовом соотношении фермент:белок – 1:100 и инкубировали в течение ночи при 37°C. Реакцию останавливали добавлением муравьиной кислоты (конечная концентрация – 5%). Затем количество белка доводили до 0,5 мг с помощью метода Брэдфорда. Процедуру обессоливания пептидов проводили на SDB RPS StageTips микроколонках. Дальнейшую процедуру обогащения фосфорилированных пептидов проводилась в соответствии с протоколом производителя.

3.2.4.9. LC-MS/MS анализ.

Протеомный анализ проводили с использованием массспектрометра Q Exactive HF (ThermoFisher). Образцы наносили на колонку C18 (Acclaim PepMap 100 C18 HPLC Columns), термостатированную при 40°C, в буфере А (0,2% муравьиная кислота). Элюцию проводили линейным (120 мин) градиентом от 4 до 55% буфера В (0,1% муравьиной кислоты, 80% ацетонитрила) в А при скорости потока 350 нл/мин. Масс-спектрометрические данные сохранялись во время автоматического переключения между MS1 сканированием и до 15 MS/MS сканирований (метод TopN). Целевое значение для сканирования MS1 было установлено равным $3 \cdot 10^6$ в диапазоне 300-1200 m/z с максимальным временем введения ионов 60 мс и разрешением

60000. Ионы-предшественники выделяли при ширине окна 1,4 m/z и фиксированной первой массе 100,0 m/z. Ионы-предшественники были фрагментированы путем высокоэнергетической диссоциации в С-ловушке с нормированной энергией столкновения 28 эВ. Сканы MS/MS сохранялись с разрешением 15000 при 400 m/z и при значении $1 \cdot 10^5$ для целевых ионов в диапазоне 200-2000 м/з с максимальным временем введения ионов 30 мс.

3.2.5. Методы работы с эукариотическими клетками.

3.2.5.1. *Культивирование клеток [155].*

Все клетки выращивали при температуре 37°C в атмосфере 5% CO₂ при 100% влажности. Первичные культуры глиобластом, полученных от пациентов, культивировали на среде IV (DMEM/F12, 2% B27, 2мМ глутамин, 20 нг/мл EGF, 20 нг/мл bFGF, пеницилин (100 ед/мл), стрептомицин (100 мкг/мл)) в виде нейросфер и при необходимости диссоциировали реагентом StemPro Accutase (Thermo Fisher). Для прикрепления клеток к стеклу или пластику поверхность предварительно инкубировали в течение ночи при комнатной температуре с раствором ламинина в PBS (1:200). Нормальные человеческие астроциты (ННА) выращивали на среде V (DMEM/F12, 10% FBS, 1% N-2 Supplement, 2мМ глутамин, пеницилин (100 ед/мл), стрептомицин (100 мкг/мл)) и при необходимости диссоциировали StemPro Accutase. Стандартные клеточные линии и выращивали на среде II (DMEM, 10% FBS, 2мМ глутамин, пеницилин (100 ед/мл), стрептомицин (100 мкг/мл)) и при необходимости диссоциировали раствором Трипсина-Версена. Клетки Phoenix-GP культивировали на среде V (DMEM/F12, 10% FBS, 2мМ глутамин, пеницилин (100 ед/мл), стрептомицин (100 мкг/мл)).

3.2.5.2. *Создание первичных клеточных линий глиобластомы [155].*

Первичные культуры получали согласно оригинальной методике, разработанной в нашей лаборатории. Через 1 – 5 часов после хирургического удаления образец опухолевой ткани массой более 0,4 г был последовательно промыт в трёх чашках Петри с 20 мл буфера PBS в каждой. Опухоль промывалась таким образом, чтобы максимально избавиться от эритроцитов, находящихся в кровеносных сосудах. Далее опухоль помещали в чашку Петри, содержащую 5 мл буфера PBS и 5 мл раствора Трипсин-Версена. С помощью пинцета и скальпеля ткань нарезали на фрагменты 1 – 2 мм в диаметре, после чего чашку Петри с опухолью инкубировали 10 мин при 37°C. Далее раствор из чашки Петри вместе с фрагментами опухоли переносили в 15 мл пробирку и пипетировали 15 – 20 раз пипеткой на 10 мл. После этого пробирку инкубировали ещё 10 минут при 37°C и суспензию снова пипетировали 15 – 20 раз пипеткой на 10 мл. Далее

пробирку инкубировали 10 минут при 37°C, после чего ещё раз пипетировали 15 – 20 раз пипеткой на 10 мл. Полученную суспензию продавливали через сито с порами 100 мкм, надетое на пробирку на 50 мл. Объём смеси доводили до 35 мл буфером PBS и после тщательного перемешивания центрифугировали 10 мин при 500 x g. Супернатант декантировали, а осадок ресуспендировали в 35 мл свежего PBS. Полученную суспензию без давления пропускали через сито с диаметром пор 70 мкм и центрифугировали 10 мин при 300 x g. Далее супернатант декантировали, а осадок ресуспендировали в 35 мл свежего PBS и повторно центрифугировали 10 мин при 300 x g. Затем супернатант удаляли, осадок ресуспендировали в 20 мл среды V, которую без давления пропускали через сито с диаметром пор 40 мкм и центрифугировали 10 мин при 300 x g. После этого осадок клеток ресуспендировали в 10 мл среды VI и выдерживали в CO₂ инкубаторе в течение суток в 25 см² матрасе (1). На следующий день неприкрепившиеся клетки со средой переносили во второй матрас (2), покрытый ламинином, а в (1) матрас добавляли 10 мл свежей среды VI. Оба матраса выдерживали в CO₂ инкубаторе в течение суток и на следующий день в матрасе (2) меняли среду на свежую, декантируя все неприкрепившиеся клетки. Далее клетки на обоих матрасах культивировали до тех пор, пока плотность клеток не становилась более 50%, и после этого клетки диссоциировали, добавляя в матрасы по 2 мл аккутазы. Затем клетки из обоих матрасов объединяли и культивировали совместно на 25 см² матрасе на среде VI в виде нейросфер. Периодически клетки переносили в новый матрас, отбрасывая те клетки, которые не откреплялись от пластика после интенсивного пипетирования.

3.2.5.3. STR анализ первичных клеточных линий [155].

Услуги были предоставлены компанией "ГОРДИЗ" (<https://gordiz.ru/>). Геномную ДНК выделяли с помощью набора DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) в соответствии с протоколом производителя. После амплификации локусов STR методом ПЦР полученные продукты были разделены с помощью капиллярного электрофореза на приборе AB 3730 DNA Analyzer (Thermo Fisher). Для точного определения молекулярной массы фрагментов ДНК использовался внутренний стандарт GeneScan500-LIZ. Значения аллелей присваивались с помощью программы Gene Marker Software Version 1.85. STR профиль всех линий глиобластомы, использованных в данной работе приведён в Таблице 2.

3.2.5.4. Трансфекция клеток плазмидной ДНК [155].

За день до трансфекции клетки пересаживали на новый культуральный пластик. В случае глиобластомы пластик предварительно покрывали ламинином. Количество клеток выбиралось таким образом, чтобы в день трансфекции плотность клеток составила 60-80%. Перед трансфекцией готовили две смеси, объём которых рассчитывался исходя из площади, в котором

производилась трансфекция. Так на 1 см² готовили по 50 мкл каждой из двух смесей. Ниже приведено количество реагентов, необходимых для трансфекции клеток, растущих на площади 1 см². В первую пробирку добавляли 0,5 мкг плазмидной ДНК, 0,5 мкл Plus Reagent и 50 мкл среды I, а во вторую пробирку – 2 мкл липофектамина LTX и 50 мкл среды I. Приготовленные смеси инкубировали в течение 5 минут при комнатной температуре, после чего смешивали друг с другом и выдерживали ещё 30 минут при комнатной температуре. После этого от клеток отбирали среду и добавляли 100 мкл полученной трансфекционной смеси и 100 мкл свежей среды для выращивания соответствующего типа клеток. Далее клетки оставляли на 24 часа в CO₂ инкубаторе, после чего среду в лунках меняли на свежую. Ещё через 24 часа трансфецированные клетки использовались для необходимых экспериментов.

3.2.5.5. Получение лентивирусных частиц [155].

За двое суток до трансфекции клетки линии Phoenix-GP были посажены в 25 см² матрас в таком количестве, чтобы в день трансфекции плотность клеток составила 40-60%. Перед трансфекцией готовили две смеси: в одну пробирку добавляли 1 мкг плазмиды pMD2.G, 3 мкг psPAX2 и 4 мкл основной лентивирусной плазмиды pCDH \square EF1 \square MCS \square IRES \square Puro, либо плазмиды pLKO.1 с целевыми вставками, 8 мкл Plus Reagent и 500 мкл среды I. Во вторую пробирку добавляли 20 мкл липофектамина LTX и 500 мкл среды I (Opti-MEM). Растворы инкубировали в течение 5 минут при комнатной температуре, после чего смешивали друг с другом и выдерживали ещё 30 минут при комнатной температуре. После этого среду из матраса с клетками аккуратно отбирали и медленно добавляли в лунки 1 мл полученной трансфекционной смеси, 1 мл среды I и 3 мл свежей среды III (DMEM/F12, 10% FBS, 1мМ пируват-Na, 2мМ глутамин, пеницилин (100 ед/мл), стрептомицин (100 мкг/мл)). Далее клетки оставляли на 24 часа в CO₂ инкубаторе, после чего среду аккуратно заменяли на среду III. На 4й день после трансфекции среду с вирусными частицами отбирали и пропускали без давления через фильтр с порами 0.45 мкм. Из среды, содержащей вирусные частицы, делали аликвоты по 1 мл, замораживали их в жидком азоте и хранили при температуре -80°C.

3.2.5.6. Трансдукция клеток лентивирусными частицами [155].

Клетки диссоциировали и помещали в лунки 6-луночного планшета по 6 \square 10⁵ клеток на лунку. Объём среды с клетками в лунках доводили до 1,5 мл соответствующей средой, после чего добавляли ещё 1 мл полученной ранее среды с вирусными частицами и полибрен до финальной концентрации 8 мкг/мл. Клетки инкубировались с вирусными частицами в течение 24 часов, после чего среду в лунках заменяли на свежую.

3.2.5.7. Селекция клеток, инфицированных лентивирусными частицами [155].

Через 48 часов после трансдукции, среду клеток заменяли на среду IV (в случае первичных культур GBM) или II (для стандартных клеточных линий), содержащую 1-2 мкг/мл Пурамицина. На следующий день среду заменяли на свежую, также содержащую 1-2 мкг/мл Пурамицина. Ещё через двое суток среду заменяли на свежую, не содержащую Пурамицин.

3.2.5.8. Иммуноцитофлуоресцентная микроскопия [155].

Для иммуноцитофлуоресцентной микроскопии клетки, находящиеся в лунках камеры Lab-Tek II, трижды промывали PBS (здесь и далее объём буфера составлял 250 мкл на лунку; все операции проводились при комнатной температуре), и обрабатывали буфером для фиксации (4% параформальдегид в PBS (pH 7,2)) в течение 15 минут. После фиксации клетки три раза промывали PBS и инкубировали с пермеабилизирующим буфером (0,25% TritonX-100 в PBS.) ещё 15 минут. Далее в лунки на 30 минут добавляли раствор 1% БСА в PBST и после этого клетки инкубировали с раствором первичных антител в PBST в течение часа. Затем клетки промывали 5 раз TBST и инкубировали ещё 1 час с раствором вторичных антител, конъюгированных с флуоресцентными красителями, в буфере PBST. Для отмывки несвязавшихся антител клетки промывали PBST ещё 6 раз и после этого, отобрав из лунок весь буфер, добавляли к клеткам раствор Fluoroshield with DAPI. Через 10 минут клетки анализировали под флуоресцентным микроскопом. Наиболее характерные для исследуемой популяции клетки фотографировали.

3.2.5.9. Определение подвижности клеток методом “зарастания царапины” [155].

Клетки диссоциировали реагентом StemPro Accutase и сажали в покрытые ламином лунки 6-луночного планшета по $1,5 \times 10^6$ клеток на лунку. На следующий день в лунке делали две перпендикулярных царапины с помощью носика пипетки на 200 мкл. Через 48 часов царапины фотографировали в световой микроскоп. Эксперимент повторяли минимум в 3х биологических повторах.

3.2.5.10. Анализ жизнеспособности клеток.

Нейросферы глиобластомы диссоциировали с помощью StemPro Accutase (Thermo Fisher) и подсчитывали с помощью автоматического счетчика клеток Countess II (Thermo Fisher), используя реагент Трипановый синий (Thermo Fisher). Клетки высевали в 96-луночный планшет с плотностью 6000 клеток в лунке в 100 мкл среды III. На следующий день в каждую лунку добавляли соответствующий препарат в 50 мкл среды. Пять дней спустя жизнеспособность

клеток оценивали с помощью реагента AlamarBlue Cell Viability Reagent (Thermo Fisher). Флуоресценцию измеряли с помощью универсального микропланшетного анализатора Fusion α-FP HT (PerkinElmer) с длиной волны поглощения 535 нм и длиной волны излучения 620 нм.

3.2.5.11. Анализ пролиферации клеток.

Клетки высевали в 96-луночный планшет с плотностью 6000 клеток в лунке в 150 мкл среды. Количество клеток оценивали с помощью реагента AlamarBlue (Thermo Fisher). Флуоресценцию измеряли с помощью универсального микропланшетного анализатора Fusion α-FP HT (PerkinElmer) с длиной волны поглощения 535 нм и длиной волны излучения 620 нм. Измерения проводились на 1, 4, 6, 8-й день.

3.2.5.12. Проточная цитофлуориметрия [155].

Окраска на поверхностный маркер CD133 проводилась согласно протоколу фирмы производителя антител anti-CD133/2-APC (Miltenyi Biotec). Для анализа использовали 2×10^5 клеток, предварительно диссоциированных StemPro Accutase.

Детекция активности каспаз 3 и 7 проводилась с помощью набора CellEvent Caspase-3/7 Green Flow Cytometry Assay Kit (Thermo Fisher) по инструкции производителя.

После окрашивания образцы анализировали с помощью проточного цитометра NovoCyte (ACEA biosciences), данные обрабатывали с помощью программного обеспечения FlowJo 10.

3.2.5.13. Сортировка клеток.

Для сортировки клеткок GBM со сверхэкспрессией белков GFP или RFP, через 2 дня после трансфекции клетки диссоциировали реагентом StemPro Accutase, ресуспендировали в 1 мл ледяного PBS и сортировали на приборе FACS Aria III (BD Biosciences).

3.2.5.14. Анализ частоты формирования нейросфер [155].

Для определения стволовых свойств клеток GBM in vitro мы использовали метод анализа частоты формирования нейросфер. Для этого клетки глиобластомы диссоциировали реагентом StemPro Accutase, подсчитывали на счётчике клеток в 4х повторях, после чего готовили суспензию клеток, содержащую 10, 50, 100, 200, 300 и 500 клеток в миллилитре среды IV. Далее каждую суспензию добавляли в 10 лунок 96 луночного планшета по 100 мкл на лунку. Планшеты выдерживали в CO₂ инкубаторе неделю, после чего в лунки добавляли по 100 мкл свежей среды IV. Через 3-7 дней (10-14 дней с момента начала эксперимента) для каждого разведения клеток

подсчитывали % лунок, не содержащих нейросферы. За нейросферу считалось скопление из более чем 8ми клеток.

3.2.5.15. *Анализ уровня трансляции.*

Для оценки уровня синтеза белка в клетках GBM использовался набор Click-iT HPG Alexa Fluor 488 (ThermoFisher) в соответствии с инструкциями производителя. Сферы диссоциировали реагентом StemPro Accutase и инкубировали в среде DMEM, не содержащей метионина (Thermo Fisher), в течение 30 мин, а затем выдерживали с реагентом HPG в течение 1 ч. Контрольные образцы предварительно обрабатывали 100 мкг/мл циклогексимида (Abcam) для ингибирования синтеза белка. Клетки фиксировали 4% параформальдегидом в PBS в течение 15 мин, пермеабелизовали 0,25% Triton X100 в PBS в течение 20 мин с последующими двумя промывками 3% BSA в PBS. Затем клетки окрашивали с использованием азида, конъюгированного с AlexaFluor-488. После тщательной промывки клетки анализировали методом проточной цитометрии или визуализировали с помощью флуоресцентного микроскопа.

3.2.5.16. *Выделение рибосом.*

Выделение рибосом проводили в соответствии с ранее опубликованным протоколом [158] с небольшими изменениями. Клетки лизировали в 1 мл лизирующего буфера (20 мм Tris pH 7,4, 150 мм KCl, 10 мм MgCl₂, 1 мм DTT, 0,5% Triton X100, 0,1% дезоксихолата Na, 24 Ед/мл ДНКазы I (Qiagen)) и инкубировали на льду в течение 20 мин. Клеточный лизат центрифугировали 10 мин при 20000g, 4°C. После центрифугирования надосадочную жидкость смешивали с 9 мл лизирующего буфера. В пробирку для центрифугирования наносили 1 мл 1 М сахарозы (20 мм Tris pH 7,5, 150 мм KCl, 10 мм MgCl₂, 1 мм DTT, 0,5% Triton X100, 0,1% дезоксихолата Na, 1 м сахарозы) и далее на этот раствор медленно наслаивали полученный в предыдущем шаге лизат клеток. Далее образцы центрифугировали при 40000 об/мин, 4 °C в течение 3 ч с использованием ротора SW 60 TI (Beckman). Осадок тщательно промывали 1 мл лизирующего буфера, а затем ресуспендировали в 70 мкл свежего лизирующего буфера.

3.2.5.17. *Фракционирование полисом.*

Нейросферы глиобластомы диссоциировали с помощью StemPro Accutase и инкубировали в ледяном PBS, содержащем 100 мкг/мл циклогексимида (Abcam) в течение 10 минут. Затем PBS удаляли и добавляли 750 мкл ледяного лизирующего буфера E (20 мм Tris-HCl, pH 7,5, 250 мм NaCl, 1,5 мм MgCl₂, 1 мм DTT, 0,5% Triton X100, 100 мкг/мл циклогексимида (Abcam), 24 U/мл ДНКазы I (Thermo Fisher), 400U/мл ингибитора РНКаз Ribo Lock). После 10-минутной инкубации во льду клетки центрифугировали в течение 10 мин при 15 000g при 4°C. Супернатант переносили

в 10-60% (м/о) градиент сахарозы, содержащий 20 мМ Трис–HCl (pH 7,5), 250 мМ NaCl, 15 мМ MgCl₂, 1 мМ DTT, и центрифугировали в роторе SW-41 при 35000 об/мин в течение 3 часов. После центрифугирования градиенты фракционировали вручную сверху вниз с последующим измерением оптической плотности при 260 нм для каждого образца с помощью спектрофотометра.

3.2.6. Методы работы с тканями.

3.2.6.1. Иммуногистохимия [155].

Парафиновые блоки тканей и их срезы были любезно приготовлены отделением патологии Университета Калифорнии Лос Анжелеса, США. Парафиновые срезы опухолей на предметных стёклах были последовательно инкубированы по 5 минут в 100 мл Ксилена, Ксилена, Ксилена, 96% Этанол, 96% Этанол, 96% Этанол, 70% Этанол и воды. Далее стёкла кипятили 15 минут в 100 мл DakoCytomation target retrieval solution pH (Dako) и оставляли в этом растворе на 30 минут при комнатной температуре до частичного остывания смеси. Затем стёкла инкубировали 5 минут в 100 мл PBS и помещали ещё на 15 минут в раствор 0.3% H₂O₂ в метаноле. После этого образцы промывали 3 раза по 5 мин в 100 мл TBST. Затем на стёкла наносили по 150 мкл раствора Serum-free protein block solution (Dako), накрывали парафильмом и оставляли на 30 мин при комнатной температуре. Далее излишки раствора стряхивали и на стёкла наносили по 150 мкл раствора первичных антител в TBST и накрывали парафильмом. Образцы инкубировали ночь при 4°C и 100% влажности. На следующий день стёкла промывали 3 раза по 10 мин в 100 мл TBST, затем на образцы наносили 150 мкл раствора EnVision+ System–HRP labeled Polymer (Dako) и накрывали парафильмом. Стёкла инкубировали час при комнатной температуре, и затем промывали 3 раза по 10 мин в 100 мл TBST. Связывание антител визуализировалась с помощью DAB peroxidase substrate kit (Vector Laboratories) по инструкции производителя.

3.2.6.2. Иммуногистофлуоресценция [155].

Парафиновые срезы опухолей на предметных стёклах были последовательно инкубированы по 5 минут в 100 мл Ксилена, Ксилена, Ксилена, 96% Этанол, 96% Этанол, 96% Этанол, 70% Этанол и воды. Далее стёкла кипятили 15 минут в 100 мл DakoCytomation target retrieval solution pH (Dako) и оставляли в этом растворе на 30 минут при комнатной температуре до частичного остывания смеси. После этого образцы промывали 3 раза по 5 мин в 100 мл TBST. Затем на стёкла наносили по 150 мкл раствора Serum-free protein block solution (Dako), накрывали парафильмом и оставляли на 30 мин при комнатной температуре. Далее излишки жидкости стряхивали и на стёкла наносили по 150 мкл раствора первичных антител в TBST и накрывали

парафильмом. Образцы инкубировали ночь при 4°C и 100% влажности. На следующий день стёкла промывали 3 раза по 10 мин в 100 мл TBST, затем на образцы наносили 150 мкл раствора вторичных антител в TBST и накрывали парафильмом. Стёкла инкубировали час при комнатной температуре, и затем промывали 3 раза по 10 мин в 100 мл TBST. Затем на образцы капали раствор DAPI. Через 10 минут ткани анализировали под флуоресцентным микроскопом.

3.2.7. Методы работы с животными.

3.2.7.1. *Имплантация человеческой глиобластомы в мозг иммунодефицитным мышам [155].*

Клетки глиобластомы диссоциировали реагентом StemPro Accutase (Thermo Fisher), дважды промывали PBS и подсчитывали на счётчике клеток. Далее объём жидкости, содержащий нужное количество клеток, переносили в 15 мл пробирку, стенки которой были заранее покрыты BSA (для этого в пробирку на 5 минут добавляли 2 мл 1% стерильного раствора BSA в PBS). Клетки центрифугировали 1000 об/мин 5 мин, после чего ресуспендировали в нужном объёме PBS и переносили в 200 мкл стерильную пробирку, находящуюся на льду. Для экспериментов использовали NOD scid иммунодефицитных мышей возрастом 6-10 недель. Мышей анестезировали, вводя внутривентриально смесь Ксилазина- Кетамина. Животное фиксировали на стереотактическом аппарате, аккуратно разрезали кожу на голове и сверлом диаметром 1 мм просверливали отверстие в черепе. Далее клетки глиобластомы ресуспендировали пипеткой на 20 мкл и микрошприцом отбирали 4 мкл клеток. Затем иглу шприца опускали на 3 мм внутрь просверленного отверстия в черепе и в течение 2х минут медленно вводили в мозг мыши 2-3 мкл суспензии клеток глиобластомы, таким образом, чтобы в животное попало 1×10^5 - 5×10^5 клеток. Далее шприц медленно вынимали из мозга животного со скоростью 1 мм в минуту. Отверстие в черепе заделывали хирургическим воском, а кожу на голове зашивали хирургическими нитками. До окончания действия анестезии животных выдерживали на подогреваемой до 30-36 °C поверхности. Через несколько недель-месяцев, когда у животных развивались явные невропатологические симптомы вследствие роста опухоли, мышам вводили двойную дозу анестезии, перфузировали 10 мл PBS и затем 10 мл фиксирующего буфера, после чего мозг с опухолью использовали для дальнейшего анализа.

3.2.7.2. *Введение мышам препаратов.*

FG1059 растворяли в смеси диметилсульфоксид: этанол: вода (1:1:3). На 15-й день после трансплантации клеток GBM мышам внутривентриально вводили раствор FG109 в дозе 10 мг/кг.

Инъекции повторяли каждые 3 дня, всего 5 раз. На основе данных о выживаемости мышей были получены кривые Каплана–Мейера.

3.2.8. Биоинформатический анализ

3.2.8.1. Анализ результатов LC-MS/MS [155].

Необработанные данные LC-MS/MS с масс-спектрометра Q Exactive HF преобразовывали в списки пиков .mgf формата с помощью программы MSConvert (ProteoWizard Software Foundation). Для этой процедуры мы использовали следующие параметры: "--mgf --filter peakPicking true". Для идентификации белков в образцах, полученных в результате иммунопреципитации, сгенерированные списки пиков были проанализированы с помощью программ MASCOT (версия 2.5.1) и X! Tandem (ALANINE, 2017.02.01) против базы данных UniProt. Проверка статистической достоверности идентификаций осуществлялась на основании поиска по реверсированной базе данных белковых последовательностей (decoy reversed database). Допустимые отклонения от массы иона предшественника и фрагмента были 20 ppm и 0.04 Да соответственно. Параметры поиска по базе данных – трипсинолиз с допущением пропуска одного сайта расщепления, фиксированная модификация – карбамидометилирование цистеина, переменная модификация – окисление метионина. Для X! Tandem мы также выбрали параметры, позволяющие быстро проверить ацетилирование N-концевого остатка белка, потерю аминокислотной группы N-концевого глутамина или потерю воды N-концевой глутаминовой кислотой. Полученные результаты были переданы в программное обеспечение Scaffold 4 (версия 4.0.7) для валидации и мета-анализа. Для оценки достоверности полученных результатов FDR была зафиксирована на уровне 5%.

Для количественного анализа необработанные данные LC-MS/MS анализировали в MaxQuant (версия 1.6.10.43) против базы данных UniProt. Для этой процедуры мы использовали следующие параметры: тип прибора Orbitrap; трипсинолиз с двумя возможными пропущенными сайтами расщепления; фиксированная модификация – карбамидометилирование (C); переменные модификации – окисление метионина, фосфорилирование серина/треонина/тирозина и ацетилирование N-конца; количественное определение без метки (LFQ). Для полученных данных проводили анализ обогащения в STRING для пептидов чей сигнал упал более чем в 10 раз по сравнению с контрольными образцами.

3.2.8.2. Анализ экспрессии генов и альтернативного сплайсинга.

Контроль качества проводился с помощью обрезки концов ридов с использованием Trimmomatic (v. 0.35). Последовательности адаптеров были удалены, после чего риды были

наложены на геном человека Homo Sapiens GRCh38 с использованием Salmon (v. 1.4). Результаты были агрегированы на геномном уровне с использованием R-пакета tcimport. 42 дифференциально экспрессируемых гена были идентифицированы с использованием R-пакета DESeq2. Чтобы сравнить образцы из нашего исследования с образцами из исследований GSE107559 и PRJEB27943, мы проводили анализ с использованием ComBat и R-пакета sva для коррекции данных. Метод главных компонент (PCA) использовался для сравнения различий между всеми образцами с использованием пакета "FactoMineR" в R.

Анализ обогащения GSVA был выполнен с использованием пакета GSVA в R по наборам генов hallmark, ontology, canonical pathways из базы данных молекулярных сигнатур (MSigDB). Функция gsva в пакете GSVA возвращает оценку обогащения для каждого образца для данной сигнатуры. Чтобы сравнить оценку обогащения между интересующими группами для данной сигнатуры, мы провели t-тест.

Для анализа альтернативного сплайсинга урезанные чтения RNAseq были сопоставлены с аннотацией генома Homo Sapiens GRCh38 с использованием STAR. Программное обеспечение STAR (версия 2.7.6) использовалось в 2-проходном режиме, где первый проход использовался для идентификации неаннотированных соединений во входных данных. Новый индекс генома был сгенерирован с использованием аннотированных соединений и общего набора новых соединений, которые были обнаружены в режиме первого прохода. Во время второго прохода мы повторно сравнивали все образцы с новым геномом. Чтобы сравнить события сплайсинга между образцами, мы запустили инструмент rMATS, используя следующие параметры, рекомендованные разработчиками: -c 0.0001 и -novel SS1 (чтения с несколькими выравниваниями по умолчанию игнорируются). Незначительные различия в сплайсинге были отфильтрованы с помощью пороговых значений $FDR < 0,05$ и значения $IncLevelDifference > 5\%$. Были проанализированы как аннотированные, так и неаннотированные события сплайсинга.

3.2.8.3. Анализ данных RIP seq и Ribo seq.

Для повышения качества ридов данные RIP-Seq были обрезаны с помощью Trimmomatic (v0.6.6). Обрезанные риды РНК-Seq сопоставляли с аннотацией генома Homo Sapiens GRCh38 с использованием STAR (v 2.7.9a) в соответствии с рекомендациями разработчиков STAR 2.4.0.1 со следующими параметрами: максимальное количество несоответствий для парных считываний составляло 4% от длины считывания, максимальное количество множественных выравниваний, разрешенных для считывания, составляло 10, неканонические соединения были удалены, минимальное количество разрешенных выступов соединения составляло 8 для неаннотированных соединений и 1 для аннотированных соединений, минимальная длина интрона составляла 20, максимальная длина интрона составляла 1000000, и количество “ложных”

соединений было сокращено. Уровень экспрессии транскрипта определяли количественно с помощью RSEM.

3.2.8.4. GSEA-анализ.

Данные об экспрессии генов и клинической информацией для когорты TCGA GBM были загружены с помощью пакета R/Bioconductor "TCGABiolinks". Пациенты с GBM были разделены на группы в соответствии со значением ρ_{si} для соответствующего 3'-сайта сплайсинга RPL22L1. Затем на основе ранее опубликованного набора данных GSE11603549 был создан набор генов "Путь ответа на низкий уровень pH" для GSEA. GSEA был выполнен с использованием программного обеспечения clusterProfiler.

3.2.8.5. Филогенетический анализ.

Степень консервативности в области RPL22L1, охватывающая экзон 2 и экзон 3, была исследована и визуализирована с помощью UCSC Genome browser [159]. Геномная последовательность с координатами chr3:170,868,007-170,868,400 (GRCh38/hg38) была проанализирована для 100 позвоночных с помощью PhyloP (phyloP100way track) [160]. Множественное выравнивание последовательностей нескольких позвоночных было выполнено с помощью мультиалайнера [161].

3.2.8.6. Статистический анализ.

Все данные представлены в виде среднего значения \pm SD. Планки погрешностей на всех рисунках показывают стандартное отклонение. Количество повторов для каждого эксперимента указано в условных обозначениях рисунка и всегда относится к независимым биологическим повторам. Статистические различия между двумя группами оценивали с помощью непарного t-критерия. Статистическую значимость графика выживаемости Каплана–Мейера определяли с помощью логарифмического рангового теста. Для вычисления значения регрессии R^2 и коэффициента корреляции Пирсона была измерена статистическая корреляция. Статистический анализ проводился с помощью Prism 6 (программное обеспечение Graphpad), если в условных обозначениях рисунка не указано иное. Различия считались статистически достоверными при $p < 0.05$. Для определения размеров выборок не использовались статистические методы. Размер выборки (количество) мышей был определен на основе наших предыдущих исследований. Никакие образцы, мыши или точки данных не были исключены из представленных анализов. Если не указано иное, все вестерн-блоты, данные FACS и микроскопические изображения являются репрезентативными для трех биологически независимых экспериментов.

4. Результаты и обсуждение.

4.1. Изучение белкового состава рибосом у разных популяций клеток GBM.

Согласно ранее проведенным исследованиям, клетки GBM, населяющие центральную («коровую») и периферическую («краевую») области опухоли, различаются по фенотипу, транскриптому и метаболиту [29, 162, 163]. Чтобы выяснить, какие именно молекулярные механизмы лежат в основе этих различий, мы сравнили протеом и транскриптом парных образцов тканей GBM («коровых» и «краевых»), а также первичных культур нейросфер, созданных из соответствующих зон опухоли. Проведенный LC-MS/MS-анализ показал, что наиболее значительные расхождения между образцами были связаны с кластером рибосомных белков (рис. 23А). Соотнеся данные LC-MS/MS и проведенного нами секвенирования РНК, мы установили, что транскриптом и протеом различаются в разных областях опухоли, то есть для них характерна пространственная изменчивость. Однако обнаруженные несовпадения крайне слабо коррелировали друг с другом: изменения транскриптома плохо соотносились с наблюдаемыми изменениями протеома (рис. 23Б).

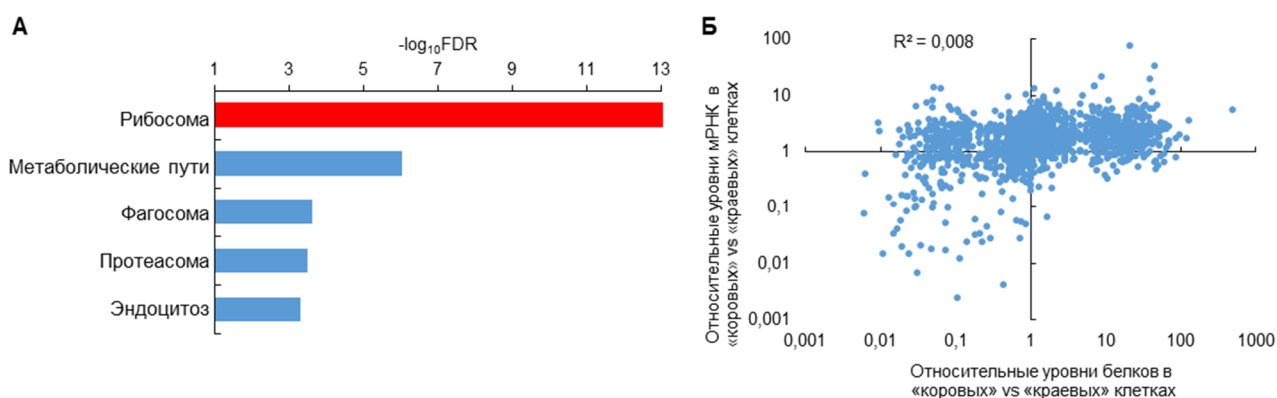


Рис. 23. А – Анализ обогащения белков, дифференциально присутствующих в центре и на периферии опухоли (по данным KEGG). Б – График корреляции между протеомом и транскриптомом тканей GBM, полученных из краевых и центральных областей одной и той же опухоли. Ось X показывает различия в уровнях белков, ось Y показывает различия в уровнях соответствующих мРНК.

Важно отметить, что как протеом, так и транскриптом нейросфер позволили нам четко различить клетки, полученные из центральной и из периферической частей опухоли (рис. 24А). Однако, мы не выявили практически никакой корреляции между различиями, обнаруженными на протеомном и транскриптомном уровнях (рис. 24Б).

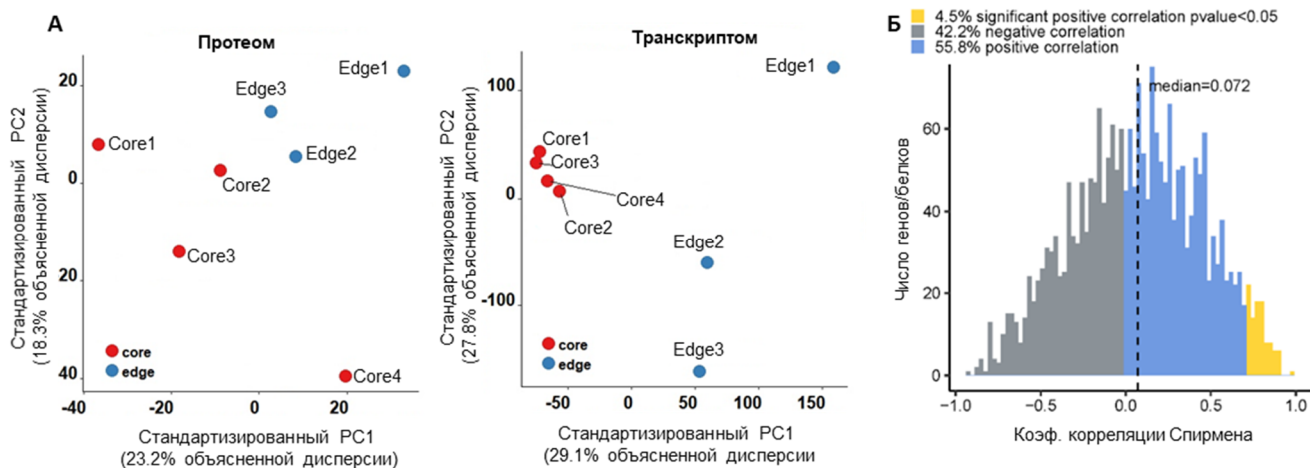


Рис. 24. *А* – Результаты анализа данных LC-MS/MS (левая панель) и РНК-секвенирования (правая панель) методом главных компонент (PCA). Для эксперимента использовались первичные культуры GBM, полученных из центра и периферии опухоли одного и того же пациента. Core – клетки GBM с «коровым» фенотипом, Edge – клетки GBM с «краевым» фенотипом. *Б* – Анализ корреляции между протеомом и транскриптомом в линиях GBM из «А». По оси X – значения коэффициента корреляции Спирмена, по оси Y – количество пар мРНК/соответствующий белок.

Так как на уровне протеома наибольшие различия были характерны для кластера рибосомных белков (RPs), мы предположили, что именно разница в белковом составе рибосом является причиной наблюдаемого несовпадения транскриптома с протеомом. Вероятно, различия в составе рибосом могут приводить к разной эффективности трансляции мРНК в клетках центра опухоли по сравнению с периферией, что и может быть причиной наблюдаемого нами расхождений между содержанием мРНК и соответствующих им белков.

Чтобы проверить эту гипотезу, мы сравнили белковый состав рибосом, выделенных из разных популяций клеток GBM. Для этого использовался метод SILAC (*Stable Isotope Labelling by Amino acids in Cell culture*). В ходе эксперимента мы выращивали «краевые» клетки на среде с изотопно-мечеными $^{13}\text{C}_6$ -лизином и $^{15}\text{N}_4$ -аргинином, а «коровые» клетки – на среде с соответствующими немечеными аминокислотами (**рис. 25А**). После того, как эффективность включения изотопной метки в клеточные белки превысила 98%, из обеих групп клеток мы выделили рибосомы и с помощью метода LC-MS/MS-масс-спектрометрии сравнили их белковый состав. Этот эксперимент выявил существенные количественные различия в RPs между «краевыми» и «коровыми» клетками (**рис. 25Б**). Однако при сравнении протеома рибосом с уровнями мРНК соответствующих генов мы не обнаружили какой-либо корреляции (**рис. 25В**), что указывает на низкое влияние уровня транскрипции на количество белка, включенного в состав рибосомы. Следующим шагом мы проанализировали сплайсинг пре-мРНК RPs и обнаружили, что наиболее значительные различия в сплайсинге наблюдались для белков, содержание которых наиболее сильно отличалось между рибосомами «коровых» и «краевых»

клеток (рис. 25Г). Эти данные позволили нам предположить, что именно альтернативный сплайсинг (AS) пре-мРНК RPs может быть причиной различий в белковом составе рибосом у разных популяций клеток GBM.

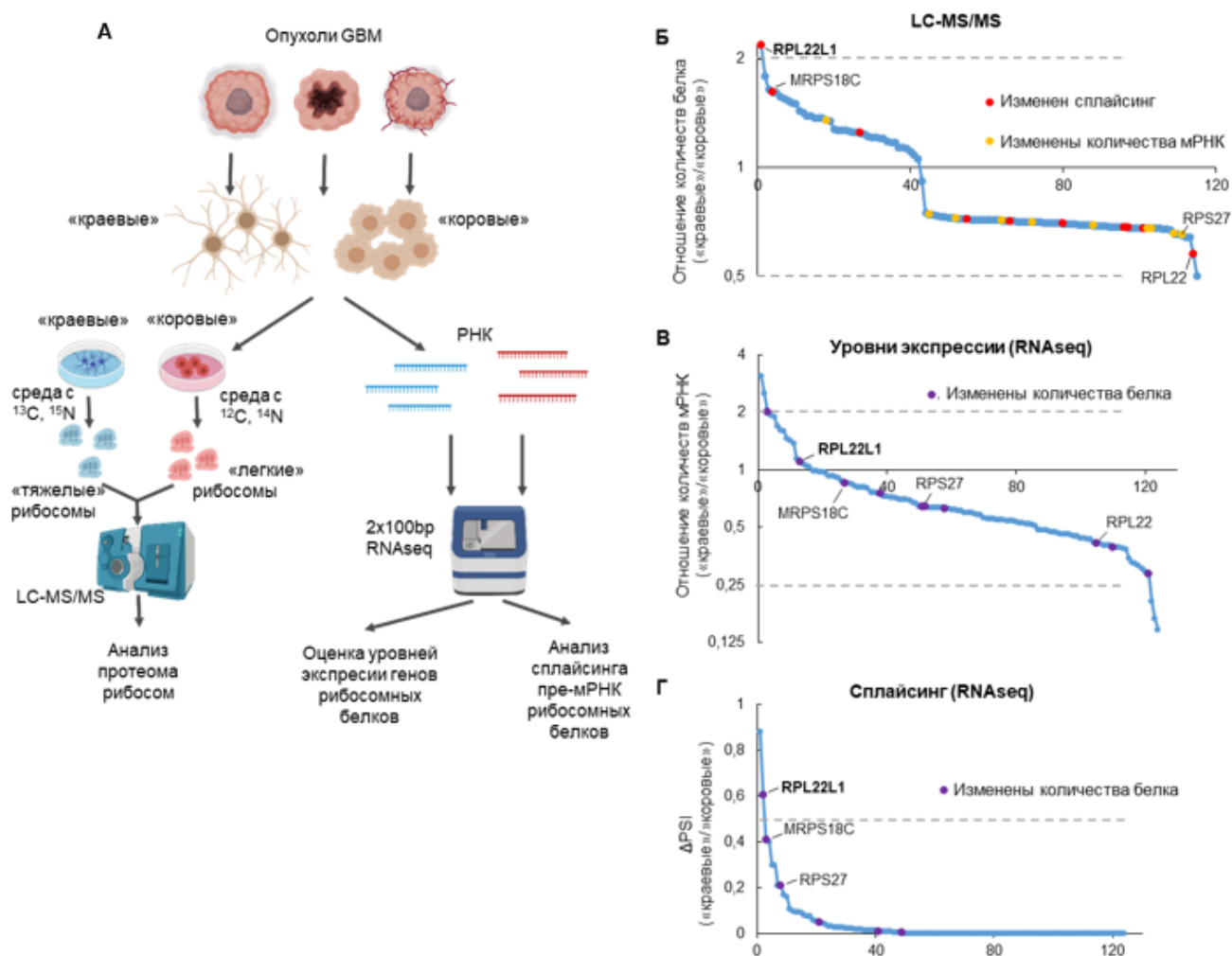


Рис. 25. А – Схема эксперимента по изучению различий в белковом составе рибосом, уровнях мРНК и альтернативном сплайсинге пре-мРНК рибосомных белков между клетками GBM с «краевым» и «коровым» фенотипом. Б – Относительные количества рибосомных белков в рибосомах, выделенных из «коровых» и «краевых» клеток GBM. В – Относительный уровень экспрессии генов рибосомных белков в «коровых» и «краевых» клетках GBM. Г – Различия в сплайсинге пре-мРНК рибосомных белков между «коровыми» и «краевыми» клетками GBM.

4.2. Исследование альтернативного сплайсинга пре-мРНК RPL22L1.

Для дальнейших исследований мы выбрали белок большой субъединицы рибосомы RPL22L1, так как он наиболее сильно отличался между «коровыми» и «краевыми» клетками глиобластомы по уровню его включения в рибосому, а также по сплайсингу его пре-мРНК (рис. 25Б и Г). Данные РНК-секвенирования показали, что в результате AS пре-мРНК RPL22L1

образуются две изоформы, одна из которых не было описана ранее. Обнаруженные изоформы различаются 5'-концом третьего экзона, что приводит к сдвигу рамки считывания и образованию новой аминокислотной последовательности на С-конце белка (**рис. 26А и Б**). Мы назвали известную изоформу RPL22L1a, а впервые описанную в данной работе – RPL22L1b.

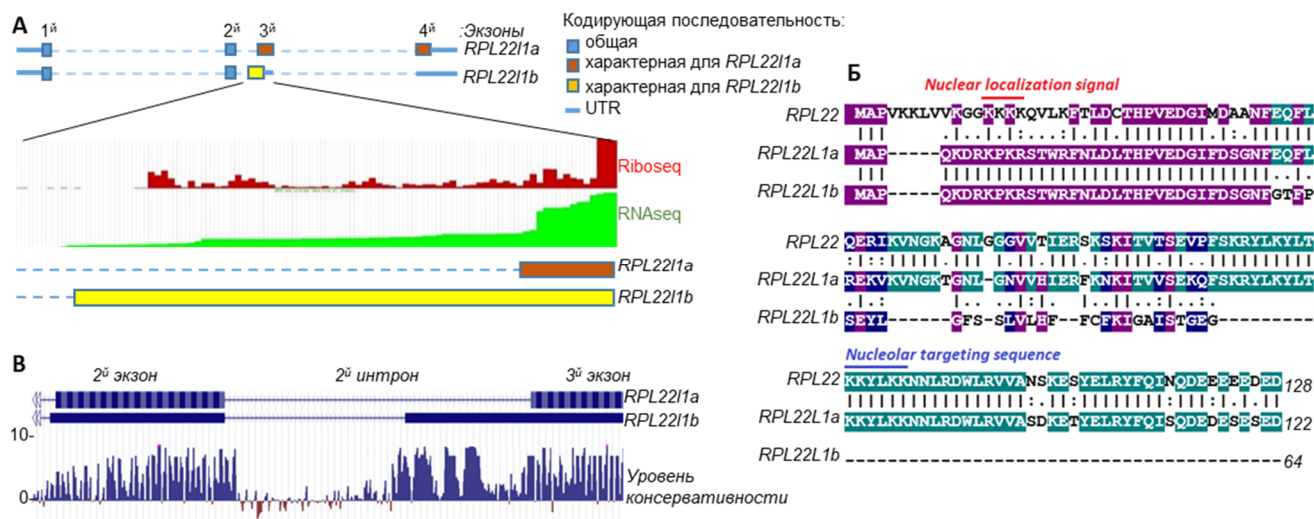


Рис. 26. **А** – Схематичное изображение последовательностей изоформ RPL22L1 вместе с данными Riboseq и RNA-seq, выровненными на соответствующие области генома. **Б** – Выравнивание аминокислотных последовательностей RPL22, RPL22L1a и RPL22L1b. Показаны последовательности ядерной (красным) и ядрышковой (голубым) локализации. **В** – Анализ консервативности последовательности ДНК области со 2-го по 3-й экзоны RPL22L1 у 100 позвоночных животных.

Мы предположили, что если новая изоформа RPL22L1 выполняет важные функции в живых клетках, то ее последовательность должна быть эволюционно консервативна среди различных организмов. PhyloP-анализ показал, что 5'-конец третьего экзона, характерный только для изоформы RPL22L1b, высококонсервативен среди позвоночных. Это резко контрастирует с последовательностью прилегающего интрона, которая не включается в мРНК RPL22L1b и имеет близкую к нулю степень консервативности (**рис. 26В**). Эти данные позволяют предположить, что изоформа RPL22L1b могла появиться на ранних стадиях эволюции позвоночных.

Так как изоформа RPL22L1b ранее не была описана, мы подтвердили присутствие ее мРНК в разнообразных нормальных тканях человека (**рис. 27А**). Интересно, что самый высокий уровень экспрессии этой изоформы был характерен для тканей головного мозга. Анализ сплайсинга пре-мРНК RPL22L1 в образцах тканей GBM показал, что соотношение RPL22L1b/RPL22L1a было по меньшей мере в 4 раза выше в центральных частях всех исследованных опухолей по сравнению с тканями периферии (**рис. 27Б**). Сходные результаты были получены при анализе сплайсинга RPL22L1 в девяти первичных клеточных линиях GBM с подтвержденным «краевым» или «коровым» фенотипом (**рис. 27В**): для «краевых» клеток было характерно наличие изоформы RPL22L1a, для «коровых» - RPL22L1b.

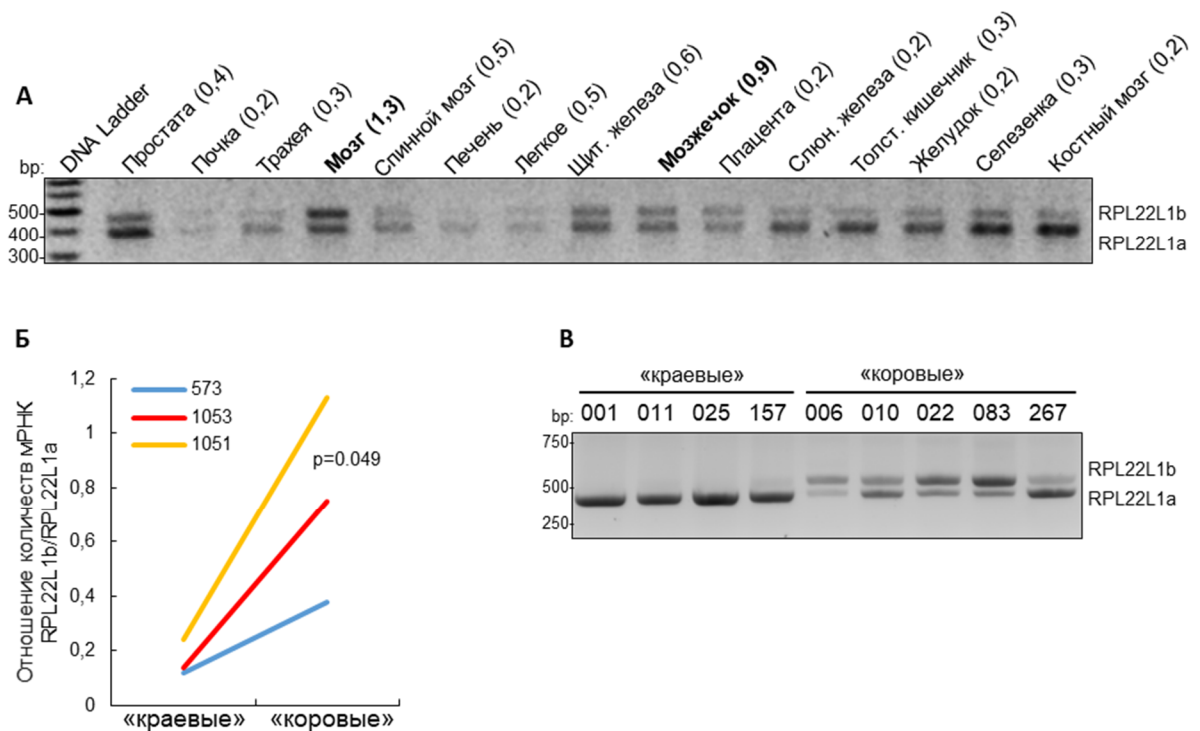


Рис. 27. *А* – Результаты ОТ-ПЦР образцов РНК, выделенных из различных тканей человека, с использованием праймеров к изоформам RPL22L1. Цифры указывают приблизительное соотношение изоформ RPL22L1b/RPL22L1a. *Б* – Соотношение изоформ RPL22L1 в парных образцах тканей GBM, выделенных из краевых и центральных областей GBM. *В* – ОТ-ПЦР образцов РНК первичных культур GBM с «краевым» или «коровым» фенотипом с праймерами к изоформам RPL22L1.

На следующем этапе мы решили подтвердить, что RPL22L1b присутствует в клетках на уровне белка. Так как использование альтернативного 3'-сайта сплайсинга в пре-мРНК RPL22L1b приводит к появлению преждевременного стоп-кодона, то, теоретически, может происходить нонсенс-опосредованный распад (NMD) образующейся мРНК. Однако недавние исследования показали, что такие прогнозы не совсем точны, и значительное число (от 5% до 30%) потенциальных мишеней NMD на самом деле не подвергаются деградации посредством этого механизма [164, 165, 166]. Чтобы проверить, деградируется ли мРНК RPL22L1b в ходе NMD, мы обработали первичные культуры GBM низкомолекулярным ингибитором NMD – NMDI-14 [167]. Как видно из **рис. 28А**, NMDI-14 не оказывал заметного влияния на количества мРНК RPL22L1b.

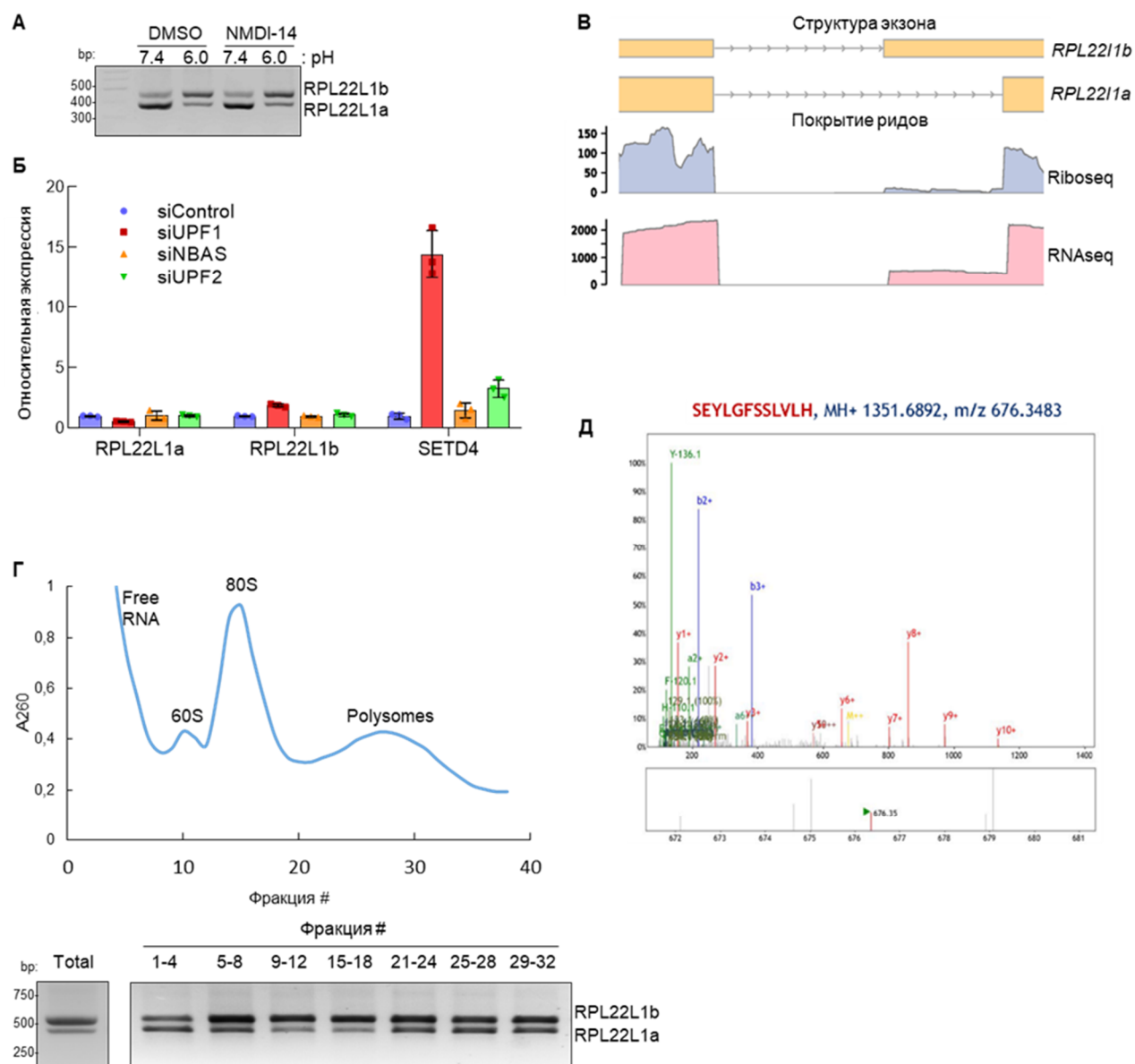


Рис. 28. *А* – Результаты ОТ-ПЦР образцов РНК из клеток GBM, культивируемых в течение 5 дней в нормальной (pH 7,4) или подкисленной (pH 6,0) среде с добавлением NMDI-14 или DMSO. *Б* – Относительная экспрессия изоформ RPL22L1 и подтвержденной мишени NMD (продукта гена SETD4), в клетках с нокаутом различных компонентов NMD аппарата [167]. Данные RNAseq взяты из GSE152437. *В* – Результаты Riboseq и RNAseq для RPL22L1 (данные были получены из набора SE141013 для клеток глиобластомы линии U251). По оси Y отложены количества прочтений (ридов). *Г* – Полисомный профиль первичной культуры 083 GBM (верхняя панель) и анализ РНК, выделенной из полисомных фракций с праймерами для RPL22L1 (нижняя панель), методом ОТ-ПЦР. *Д* – Результаты масс-спектрометрической идентификации пептида, относящегося к изоформе RPL22L1b (данные были получены из набора PXD004023).

Чтобы дополнительно подтвердить, что мРНК RPL22L1b транслируется в белок и не подвергается NMD, мы провели биоинформатический анализ данных РНК-секвенирования (GSE152437 [168]) клеток с нокаутом компонентов аппарата NMD. Из **рисунка 28Б** видно, что нарушение NMD лишь незначительно влияло на уровень мРНК RPL22L1b, в отличие от уровня

подтвержденных мишеней NMD. Это свидетельствует в пользу того, что мРНК RPL22L1b не подвергается активной деградации посредством NMD.

Следующим шагом, мы проанализировали данные баз GWIPS-viz и GEO (набор GSE14101345) [169, 170], содержащие результаты Ribo-seq и RNA-seq человека, и обнаружили фрагмент мРНК, который является уникальным для изоформы RPL22L1b (**рис. 26А** и **рис. 28В**). Это свидетельствует в пользу того, что мРНК RPL22L1b не только не деградирует, но и транслируется, давая начало соответствующему белку. Поэтому далее мы экспериментально продемонстрировали, что в клетках GBM, полученных от пациентов, мРНК RPL22L1b ассоциирована с фракцией полирибосом и, следовательно, активно транслируется (**рис. 28Г**). Наконец, с помощью биоинформатического анализа протеомной базы данных [171] нам удалось обнаружить пептид SEYLGFSLVLH, характерный только для изоформы RPL22L1b (**рис. 28Д**). Этот результат свидетельствует об экспрессии в клетках эндогенного белка RPL22L1b.

На следующем этапе мы постарались напрямую детектировать белок RPL22L1b в клетках глиобластомы. Сложность этой задачи заключается в отсутствии антител, специфичных к RPL22L1b. Тем не менее, мы провели иммуноблоттинг с антителами к N-концу RPL22L1, последовательность которого идентична у обеих изоформ, а также антителами к полноразмерному RPL22L1. В соответствии с ранее полученными данными РНК-секвенирования и ОТ-ПЦР, мы продемонстрировали, что клетки GBM с «краевым» фенотипом экспрессируют стандартную изоформу RPL22L1a, в то время как в «коровых» присутствует вариант белка с меньшей молекулярной массой. Так как этот более легкий белок можно обнаружить только антителами к N-концу RPL22L1, то, скорее всего, он представляет собой изоформу RPL22L1b (**рис. 29А**). Кроме того, мы провели иммунофлуоресцентное окрашивание четырех стандартных линий раковых клеток, а также первичных культур GBM, полученных от шести разных пациентов, с использованием антител к N-концевой последовательности изоформ RPL22L1. Интересно, что в клетках, которые, согласно данным РНК-секвенирования и ОТ-ПЦР, преимущественно экспрессируют RPL22L1a (**рис. 29Б**, верхний ряд), окрашивание происходило в основном в цитоплазме, в то время как в клетках с преимущественной экспрессией RPL22L1b (**рис. 29Б**, нижний ряд), окрашивание происходило в ядре. Таким образом, данные, приведённые выше, убедительно свидетельствуют о присутствии эндогенного белка RPL22L1b во многих типах клеток, включая GBM.

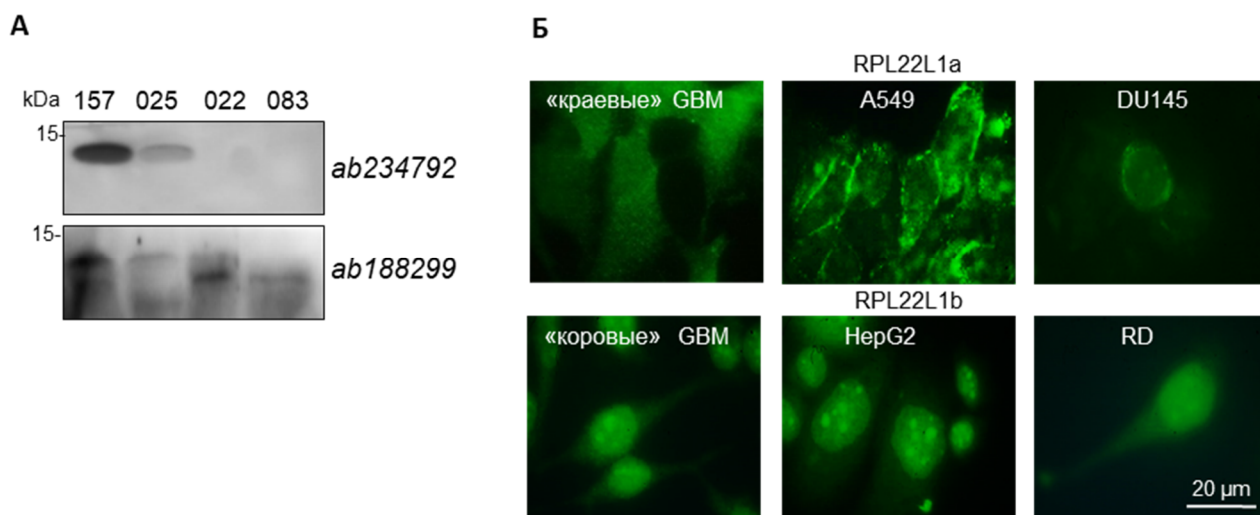


Рис. 29. *А* – Результаты иммуноблоттинга лизатов первичных культур GBM с «краевым» (157, 025) и «коровым» (022, 083) фенотипами с различными антителами к RPL22L1. Верхняя панель – детекция антителами к полноразмерному белку RPL22L1, нижняя панель – детекция антителами к N-концу RPL22L1, последовательность которого идентична у обеих изоформ. *Б* – Флуоресцентные микрофотографии клеток, преимущественно экспрессирующих изоформу RPL22L1a (верхняя панель) или изоформу RPL22L1b (нижняя панель), окрашенных с помощью антител к N-концевой части RPL22L1.

Наконец, мы проанализировали связь типа сплайсинга пре-мРНК RPL22L1 с продолжительностью жизни пациентов. Биоинформатический анализ базы данных TCGA показал, что экспрессия RPL22L1b у пациентов с GBM коррелирует с более короткой выживаемостью (**рис. 30**). Интересно, что для GBM прогностическая значимость RPL22L1 была ниже, чем для других типов опухолей. Так, при карциноме коры надпочечников повышенный уровень RPL22L1b был связан с более ранней гибелью больных, тогда как при увеальной меланоме и раке почек он, наоборот, коррелировал с более длительной выживаемостью пациентов.

Результаты, описанные выше, позволяют сделать вывод о том, что обнаруженная в нашей работе новая изоформа RPL22L1b экспрессируется как в нормальных тканях, так и в опухолях, и что внутриклеточная локализация этой изоформы отличается от известной изоформы RPL22L1a.

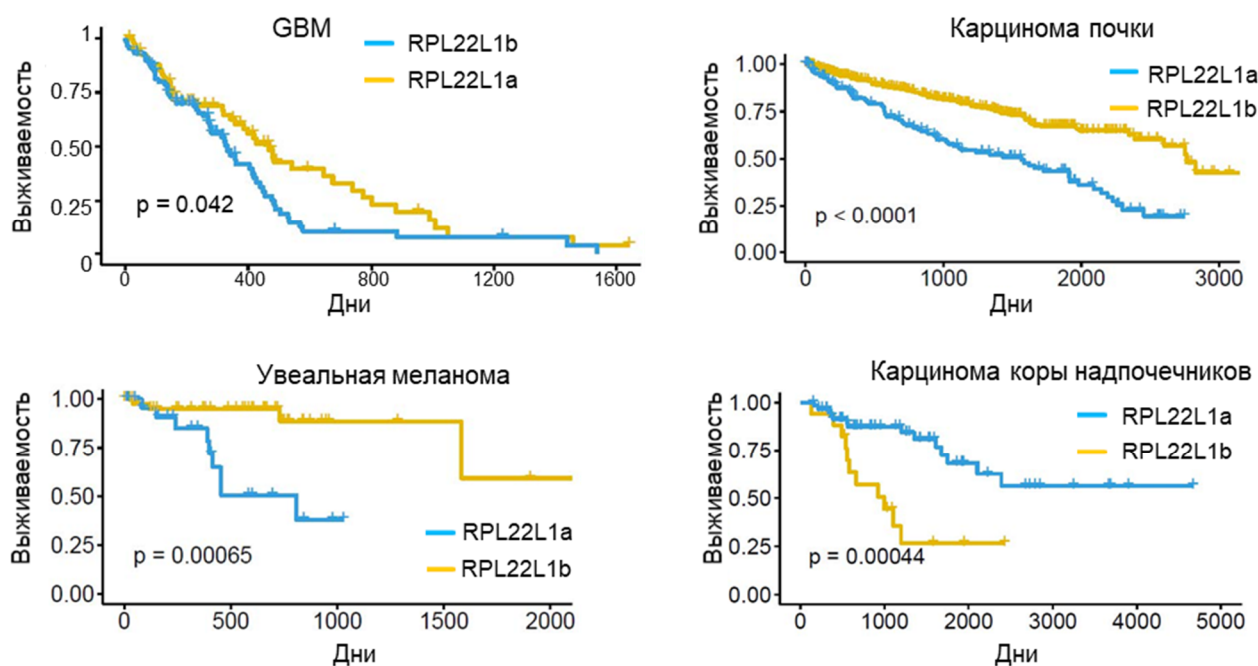


Рис. 30. Кривые Каплана-Мейера, показывающие общую выживаемость пациентов с GBM, карциномой почек, увеальной меланомой и раком коры надпочечников, разделенных на группы на основе типа сплайсинга RPL22L1 ($p < 0,001$, логарифмический тест). Данные RNAseq были получены из базы данных TCGA.

4.3. Изучение функций изоформ RPL22L1 в клетках GBM.

4.3.1. Изучение факторов, приводящих к образованию изоформы RPL22L1b в клетках GBM.

Чтобы понять в каких случаях в клетках глиобластомы происходит образование RPL22L1b мы культивировали нейросферы *in vitro* в различных условиях: в кислой среде; при гипоксии; в виде монослоя на слое ламинина; в отсутствие витаминов; без глюкозы; без факторов роста; в присутствии темозоломида. Как видно из **рис. 31А**, только воздействие кислого pH приводило к появлению RPL22L1b, причем количества мРНК RPL22L1b зависело как от времени культивирования так и от значений pH среды. (**рис. 31Б, В**). Стоит отметить, что в этих условиях ингибитор NMD также не оказывал влияния на количество мРНК RPL22L1b (**рис. 28А**).

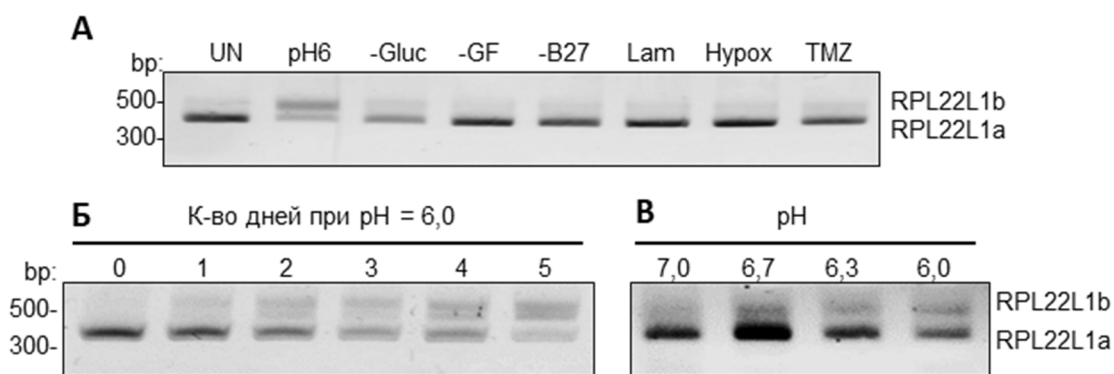


Рис. 31. *А* – Оценка экспрессии РНК изоформ RPL22L1 в образцах культур GBM, которые культивировались при различных условиях. Обозначения: UN – контрольные необработанные клетки в нормальной среде; pH6 – pH культуральной среды доводили до 6,0; -Gluc – среда без глюкозы; -GF – среда без факторов роста; -B27 – среда без питательной добавки; Lam – клетки, культивируемые в виде монослоя на ламинине; Hypox – клетки, культивируемые в условиях гипоксии; TMZ – клетки, культивированные в присутствии 50 мкм темозоломида. *Б* – Анализ количеств мРНК изоформ RPL22L1 при культивировании на средах с различным pH. *В* – Анализ количества мРНК RPL22L1b с течением времени при культивировании на среде с pH 6,0.

Чтобы изучить, влияет ли внеклеточный pH на соотношение изоформ RPL22L1 *in vivo*, мы исследовали внутриклеточную локализацию RPL22L1a и RPL22L1b в тканях GBM, полученных от пациентов. В первом эксперименте мы окрасили большой участок ткани GBM, который содержал несколько морфологически различных зон, антителами к N-концевой части RPL22L1. Наши результаты показали, что в некоторых областях опухоли RPL22L1 был локализован в цитоплазме, в то время как в других областях RPL22L1 имел преимущественно ядерную локализацию (**рис. 32А**). Чтобы количественно оценить эти различия, мы провели анализ колокализации окрашивания DAPI и RPL22L1. Как и ожидалось, области, где RPL22L1 имел ядерную локализацию, показали положительный коэффициент корреляции, тогда как области с цитоплазматической локализацией продемонстрировали отрицательный коэффициент корреляции (**рис. 32Б**). Исходя из этих данных мы можем предположить, что зоны опухоли с ядерной окраской RPL22L1 соответствуют областям с низким pH, в которых присутствует изоформа RPL22L1b, в то время как области с цитоплазматическим окрашиванием RPL22L1 соответствуют областям с нормальным pH, в которых экспрессируется изоформа RPL22L1a.

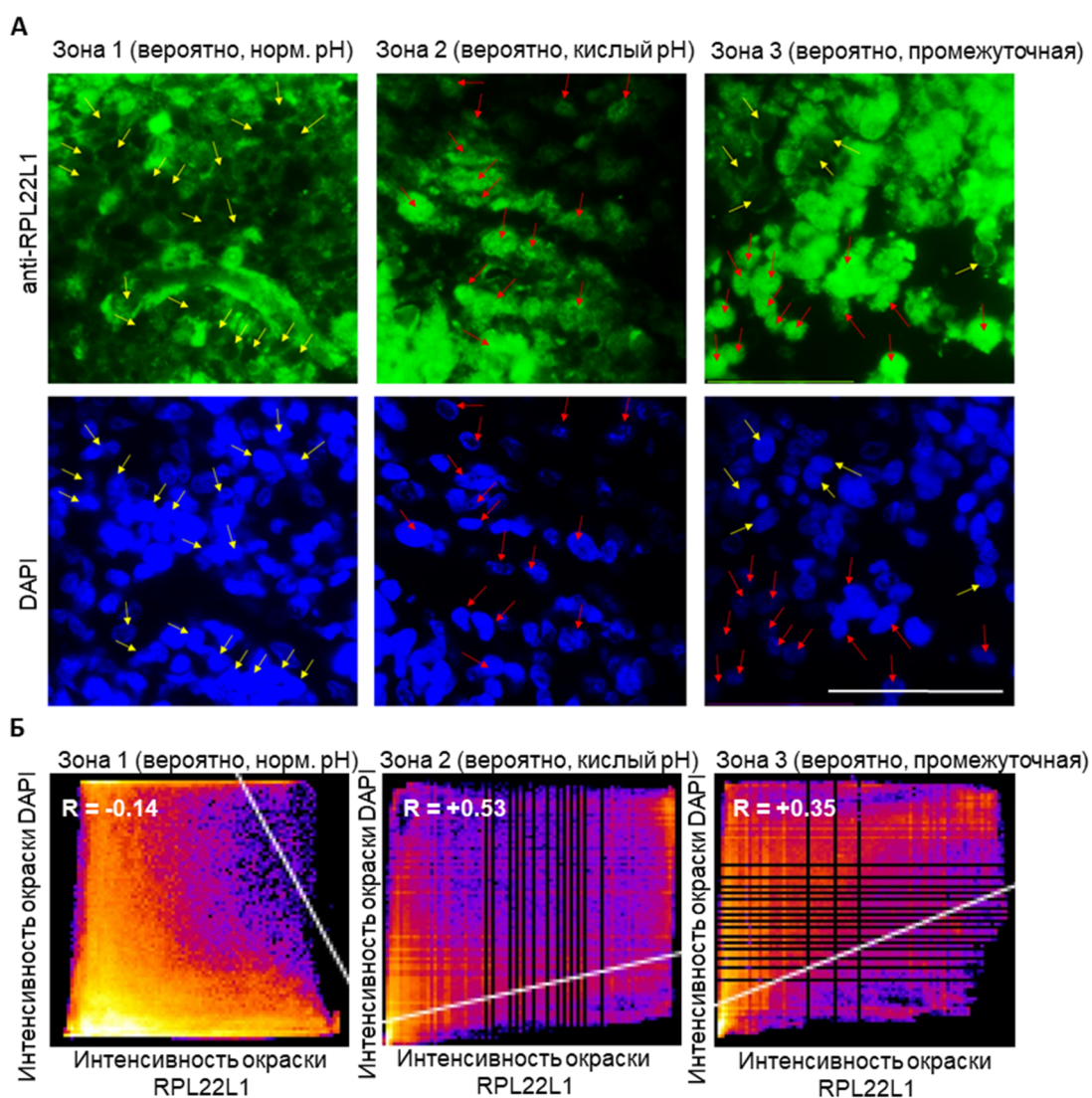


Рис. 32. А – Иммунофлуоресцентное окрашивание различных участков тканей GBM у пациента 1051 антителами к RPL22L1 (зеленый) и DAPI (синий). Желтые и красные стрелки указывают на клетки с цитоплазматической и ядерной локализацией RPL22L1 соответственно. **Б** – Анализ колокализации окрашивания RPL22L1 и DAPI для областей опухоли, указанных в “А”. Обозначено значение коэффициента Пирсона (R).

Чтобы подтвердить эту гипотезу, мы использовали рН-взвешенную молекулярную МРТ для получения парных образцов тканей GBM из областей опухоли с закисленным и нормальным внеклеточным рН (**рис. 33А**). Последующее иммунофлуоресцентное окрашивание образцов от четырех разных пациентов антителами к RPL22L1 и красителем DAPI показало, что области с низким рН содержат повышенное количество изоформы RPL22L1b, расположенной в ядре (**рис. 33Б**). Это указывает на то, что закисленное микроокружение действительно смещает сплайсинг в сторону образования RPL22L1b в глиомах человека *in situ*.

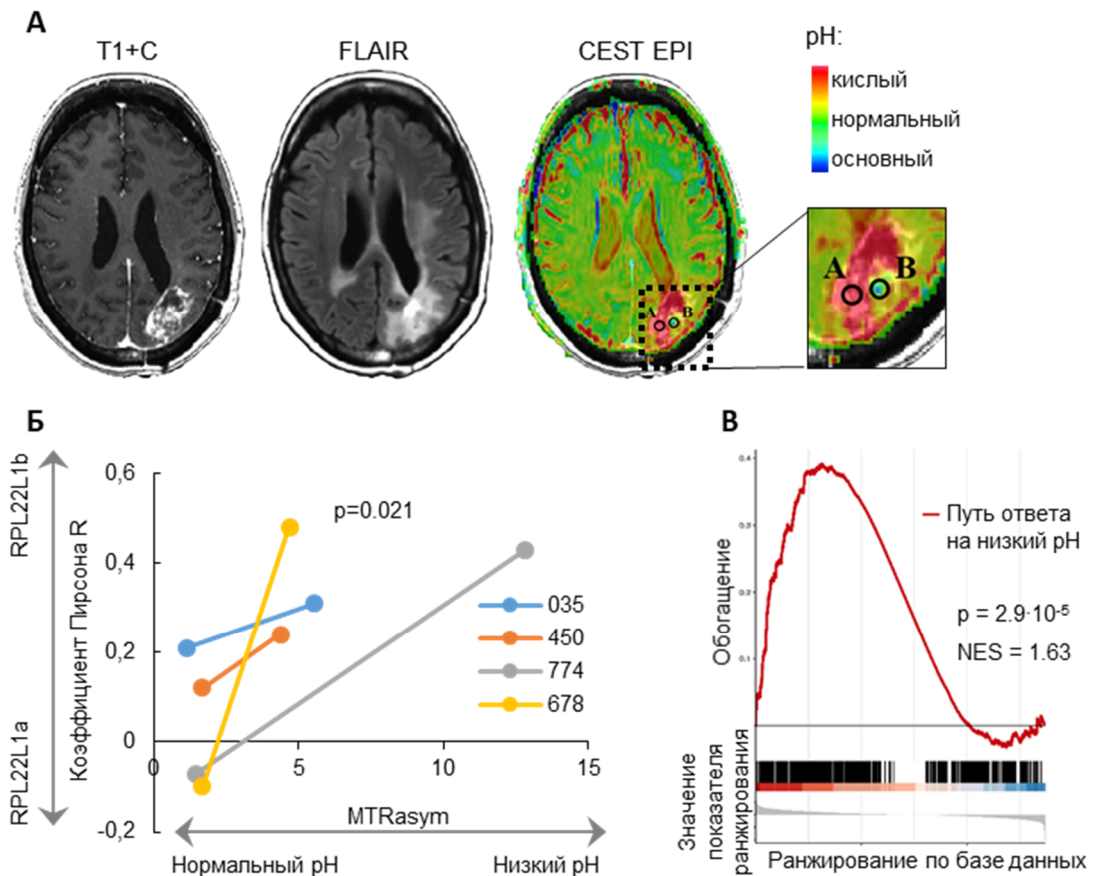


Рис. 33. *A* – Результаты MPT опухоли GBM с контрастным усилением. Слева направо: постконтрастные T1-взвешенные изображения (показывают границы опухоли), T2-взвешенные изображения FLAIR (визуализация границ воспаления), и pH-взвешенные МР-изображения CEST EPI (показывают изменения pH). Области, которые использовались для получения биопсий с низким и нормальным pH, обозначены как «A» и «B» соответственно. *Б* – Соотношение коэффициента колокализации окрашивания RPL22L1 и DAPI и значений MTRasym для соответствующих образцов опухоли. MTRasym отображает кислотность области опухоли: большие значения MTR_{asym} соответствуют меньшему значению внеклеточного pH; коэффициент колокализации отражает соотношение изоформ RPL22L1b/RPL22L1a. *В* – Анализ данных РНК-секвенирования тканей GBM с высоким и низким соотношением RPL22Lb/RPL22L1 методом GSEA. Данные были получены из базы данных TCGA ($p = 2,9 \cdot 10^{-5}$). Набор генов «Путь ответа на низкий pH» был создан на основе набора данных GSE116035.

Чтобы дополнительно подтвердить, что переключение сплайсинга RPL22L1 происходит в ответ на закисление микроокружения в опухолях пациентов, мы использовали ранее опубликованный набор генов, экспрессия которых изменяется в условиях низкого pH, и создали набор «Путь ответа на низкий pH» для дальнейшего анализа обогащения генов методом GSEA (Gene Set Enrichment Analysis). Затем, используя базу данных TCGA, мы разделили пациентов с GBM на две равные группы в соответствии с соотношением изоформ RPL22L1 и сравнили активацию пути ответа на пониженную кислотность среды. Наши результаты показали, что

высокое соотношение RPL22L1b/RPL22L1a действительно связано с активацией ответа клеток GBM на уменьшение pH ($p = 2,9 \cdot 10^{-5}$) (рис. 33В).

4.3.2. Определение функций изоформ RPL22L1.

Чтобы получить представление о функциях изоформ RPL22L1, мы создали первичные культуры GBM со сверхэкспрессией соответствующих белков. Интересно, что сверхэкспрессия одной изоформы RPL22L1 приводила к снижению экспрессии другой изоформы, что указывает на существование механизма взаимного отрицательного регулирования (рис. 34А). Проведя иммунофлуоресцентное окрашивание клеток антителами к RPL22L1, мы подтвердили эти данные для соответствующих белков: клетки с преимущественной экспрессией эндогенного RPL22L1b демонстрировали ядерную окраску, однако после сверхэкспрессии экзогенного RPL22L1a окрашивание в ядре пропадало и наблюдалось исключительно в цитоплазме, что характерно для изоформы RPL22L1a (рис. 34Б).

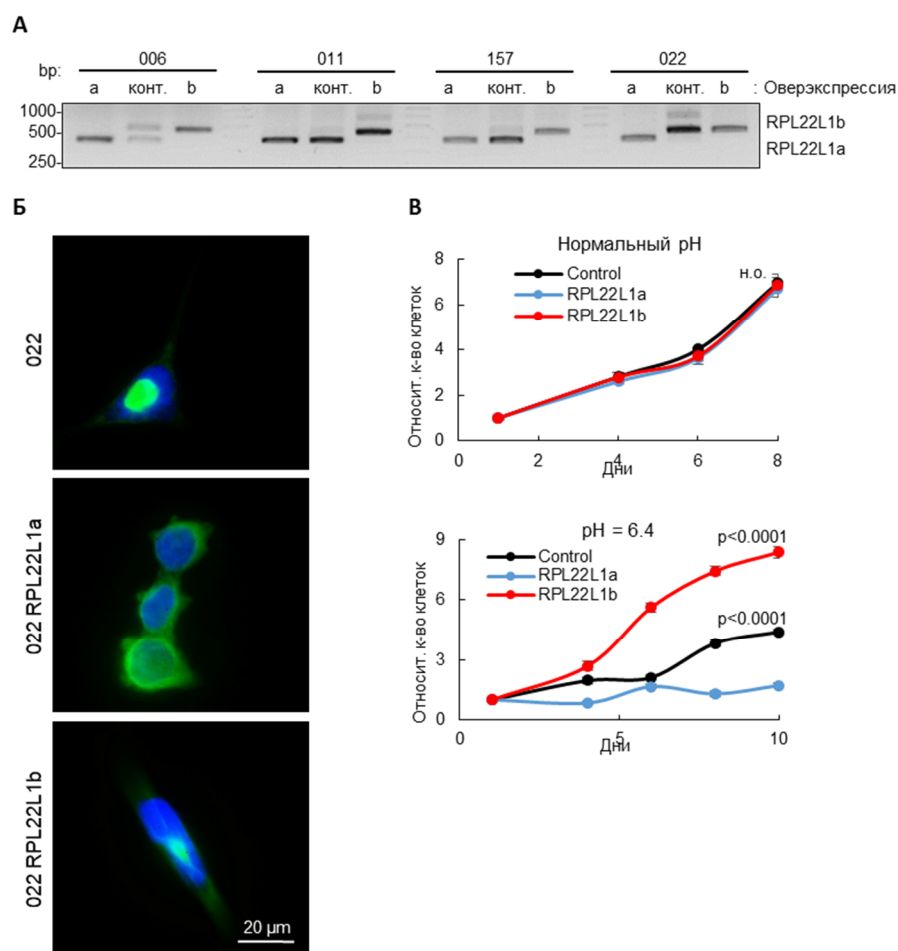


Рис. 34. А – Результаты ОТ-ПЦР образцов РНК, выделенных из первичных культур GBM, полученных от 4 разных пациентов (009, 011, 157, 022) и впоследствии трансдуцированных

лентивирусами, кодирующими RPL22L1a (a), RPL22L1b (b) или пустой вектор (конт.), с праймерами к RPL22L1. **Б** – Иммунофлуоресцентные микрофотографии окрашенной антителами к N-концевой части RPL22L1 первичной культуры 022 GBM, сверхэкспрессирующей RPL22L1a, RPL22L1b или пустой вектор. **В** – График скорости роста первичной культуры GBM, клетки которой были трансдуцированы лентивирусами, кодирующими RPL22L1a, RPL22L1b или пустой вектор (контроль), и культивировались в нормальной (pH 7,4) или подкисленной среде (pH 6,4).

Далее мы проверили, может ли сверхэкспрессия RPL22L1a или RPL22L1b влиять на пролиферацию клеток GBM в нормальной или кислой среде (**рис. 34В**). В обычной среде все тестируемые клетки демонстрировали одинаковую скорость роста. Однако при pH≈6,4 только клетки со сверхэкспрессией RPL22L1b сохраняли скорость пролиферации неизменной. Контрольные клетки, трансдуцированные пустым вектором, в условиях низкого pH росли в 2 раза медленнее, а клетки с оверэкспрессией RPL22L1a не могли пролиферировать вовсе. Кроме того, экспрессия изоформы RPL22L1a значительно увеличивала гибель клеток при воздействии низкого pH (**рис. 35**).

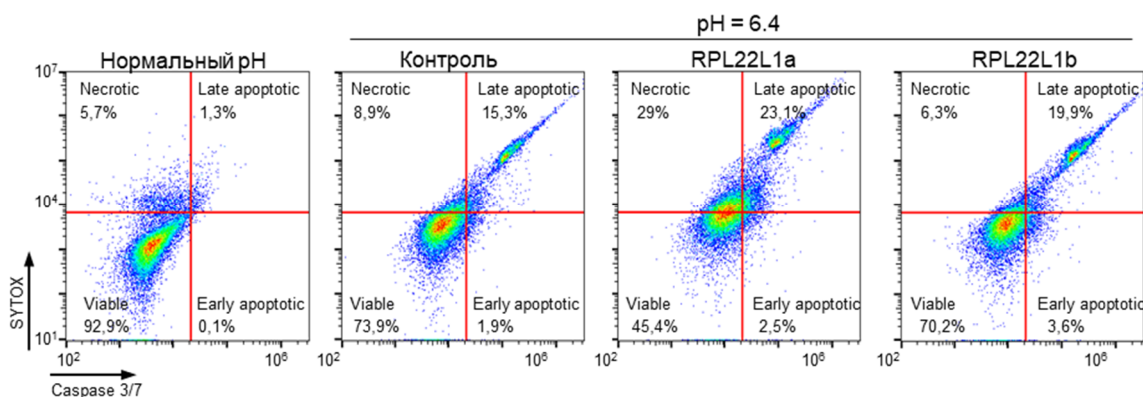


Рис. 35. FACS-анализ активности каспазы 3/7 и окрашивание SYTOX клеток 157 GBM, которые были трансдуцированы лентивирусами, кодирующими RPL22L1a, RPL22L1b или пустой вектор (контроль) и культивировались в нормальной (pH 7,4) или подкисленной среде (pH 6,4) в течение 8 дней.

Интересно, что изоформы RPL22L1 сильно влияли на внешний вид GBM: клетки, сверхэкспрессирующие RPL22L1a, росли в виде прикрепленного к пластику монослоя, что довольно необычно для первичных культур GBM, а клетки со сверхэкспрессией RPL22L1b формировали плотные нейросферы неправильной формы, напоминающие культуры, обогащенные стволовыми клетками (**рис. 36А**).

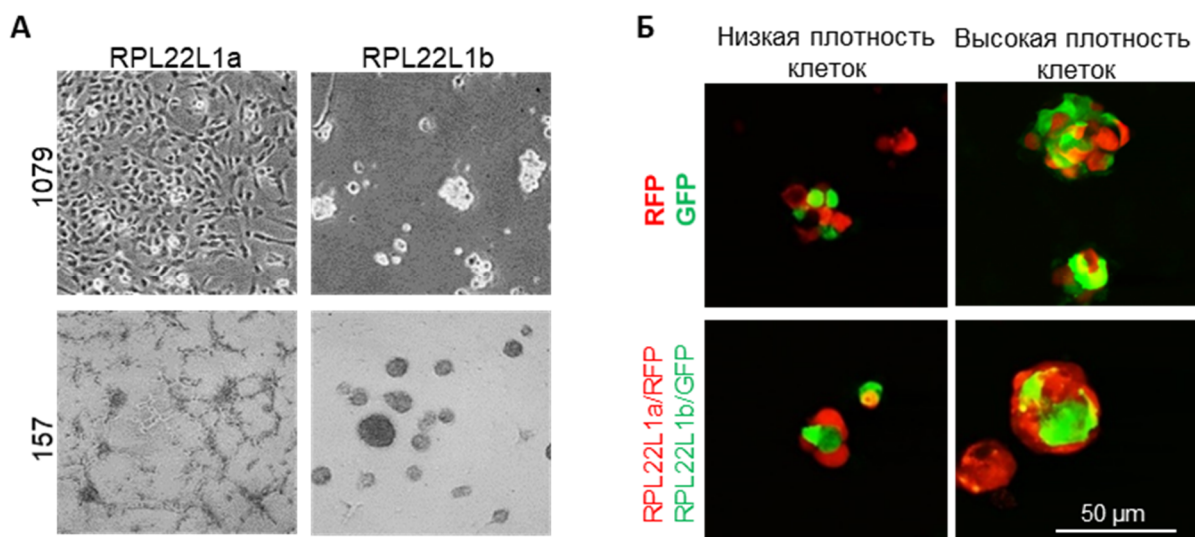


Рис. 36. *А* – Микрофотографии морфологических изменений клеток GBM при сверхэкспрессии изоформ RPL22L1. *Б* - Флуоресцентные микрофотографии нейросфер GBM полученные при совместном культивировании клеток сверхэкспрессирующих RPL22L1a/RFP или RPL22L1b/GFP.

Поскольку, согласно нашим данным, изоформа RPL22L1a характерна для «краевых» клеток GBM, а RPL22L1b, напротив, для «коровых», мы исследовали локализацию клеток со сверхэкспрессией RPL22L1a и RPL22L1b при совместной культивации. Для этого мы одновременно трансдуцировали клетки GBM лентивирусами, кодирующими флуоресцентные белки (GFP или RFP) и лентивирусами, кодирующими изоформы RPL22L1. После получения клеточных линий, стабильно экспрессирующих RPL22L1a/RFP и RPL22L1b/GFP, культуры смешивали друг с другом для дальнейшей культивации и образования нейросфер. В результате нам удалось показать, что клетки, сверхэкспрессирующие RPL22L1a/RFP, располагались на периферии нейросфер, тогда как клетки с RPL22L1b/GFP находились в центре (**рис. 36Б**).

Наконец, мы изучили влияние изоформ RPL22L1 на рост опухоли *in vivo*. Для этого в мозг шестинедельных иммунодефицитных мышей NOD SCID (Prkdcscid) были инъектированы клетки GBM, сверхэкспрессирующие исследуемые изоформы. Как видно из графиков на **рис. 37А**, мыши, которым были введены клетки с экспрессией RPL22L1b погибали раньше. Последующие иммуногистохимические окрашивания ксенотрансплантатов выявили значительное увеличение маркера «коровых» клеток CD109, в опухолях сформированных клетками с сверхэкспрессией RPL22L1b (**рис. 37Б**).

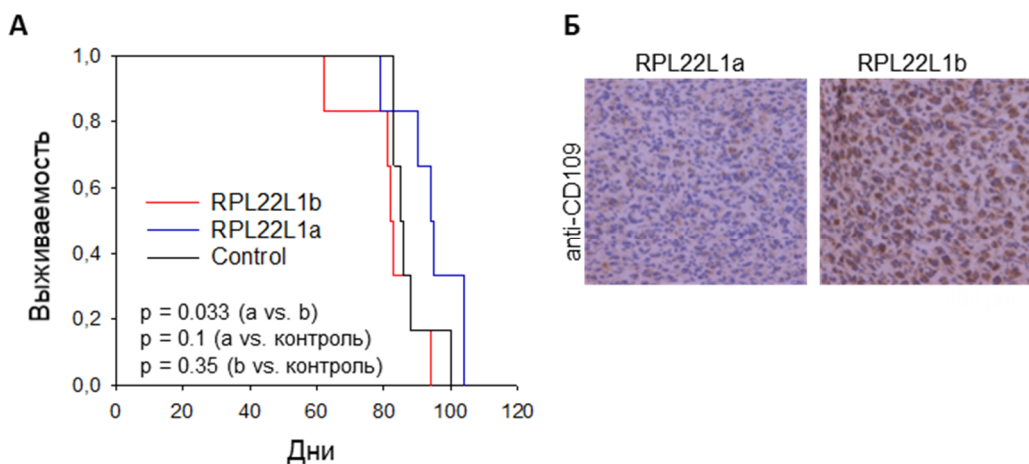


Рис. 37. *А* – Кривые Каплана-Майера, показывающие выживаемость иммунодефицитных мышей, в мозг которых были введены клетки GBM человека с гиперэкспрессией RPL22L1a (красным), RPL22L1b (синим) или пустым вектором (контроль, черным). *Б* – Результаты иммуногистохимического окрашивания антителами к CD109 срезов опухолей, полученных от мышей с ксенотрансплантатами.

На основе данных, описанных выше, мы пришли к выводу, что RPL22L1b экспрессируется в центральной части опухоли при закислении внеклеточного pH и способствует пролиферации и выживанию клеток в неблагоприятных условиях микроокружения. Это, в конечном итоге, способствует прогрессии опухоли в целом.

4.3.3. Изучение интерактома изоформ RPL22L1 в клетках GBM.

Чтобы выяснить конкретные функции изоформ RPL22L1, мы идентифицировали белки, которые взаимодействуют с RPL22L1a и RPL22L1b, используя два взаимодополняющих подхода. В первом случае выделенные из бактерий рекомбинантные белки RPL22L1a и RPL22L1b с His₆-тагом иммобилизовали на магнитных частицах с Ni-NTA. Далее эти частицы инкубировали с лизатами клеток GBM, связавшиеся белки идентифицировали с помощью LC-MS/MS. Анализ результатов этого эксперимента показал, что RPL22L1a взаимодействует с белками, участвующими в регуляции трансляции, в то время как RPL22L1b связывается с комплексом U1 snRNP, который участвует в процессе сплайсинга пре-мРНК (**рис. 38А**). Во втором варианте эксперимента мы гиперэкспрессировали в клетках GBM изоформы RPL22L1, меченные Fc-тагом. Далее с помощью Protein-A/G-магнитных частиц выделяли Fc-RPL22L1a и Fc-RPL22L1b, а также связавшиеся с ними белки. Для определения выделенных белков был использован метод LC-MS/MS-масс-спектрометрии. При такой постановке эксперимента нам удалось идентифицировать меньшее количество белков, однако полученные данные хорошо

согласовались с результатами предыдущего опыта (**рис. 38Б**): RPL22L1a взаимодействовал с компонентами рибосомы, а RPL22L1b принимал участие в регуляции стабильности РНК.

Белок RPL22L1, благодаря наличию РНК-связывающего домена, способен напрямую взаимодействовать с рРНК и мРНК [150, 154]. Поэтому следующим шагом мы определили молекулы РНК, связывающиеся с Fc-RPL22L1a и Fc-RPL22L1b. Для выделения молекул-партнеров изоформ RPL22L1 мы использовали метод РНК-преципитации. Для этого клетки GBM были трансдуцированы вирусами, кодирующими Fc-меченые RPL22L1a, RPL22L1b или контрольный белок. Далее из клеток с помощью магнитных частиц были выделены соответствующие Fc-меченые целевые белки вместе со связавшимися с ними молекулами РНК. Капиллярный электрофорез, проведенный после элюции выделенной РНК, подтвердил взаимодействие RPL22L1a с рибосомальной РНК (**рис. 38В**). Напротив, RPL22L1b не взаимодействовал с рРНК однако связывался со множеством других РНК. Деpletion рРНК и последующее РНК-секвенирование показали, что в дополнение к рРНК RPL22L1a взаимодействовал с мРНК белков, участвующих в дифференцировке стволовых клеток и сигнальном пути АКТ (**рис. 38Г**). Напротив, RPL22L1b взаимодействовал с мРНК белков, которые регулировали сплайсинг и апоптоз, а также с большим количеством различных длинных некодирующих РНК.

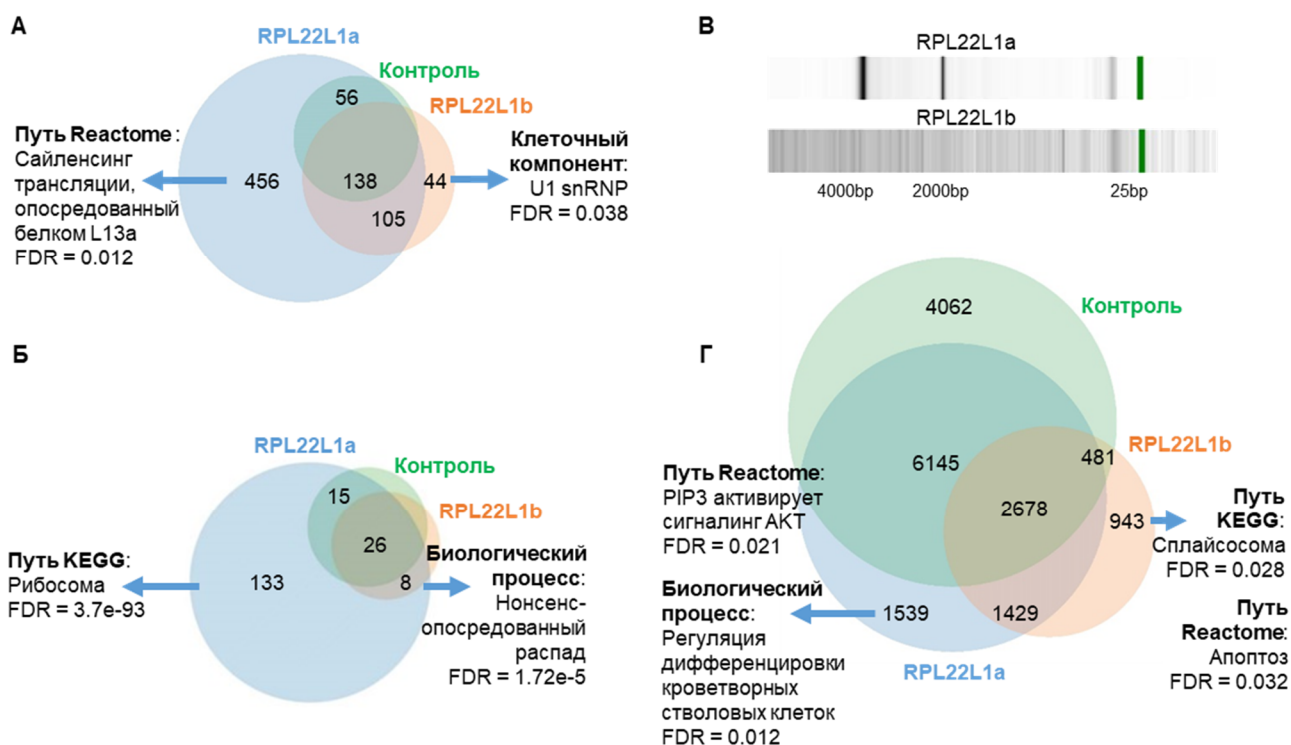


Рис. 38. А – Сравнительный анализ белков, связавшихся с рекомбинантными His₆-мечеными RPL22L1a (синим), RPL22L1b (красным) или контролем – пустыми магнитными частицами (зеленым). Б – Сравнительный анализ белков, связавшихся с Fc-мечеными RPL22L1a (синим), RPL22L1b (красным) или

контрольным белком (зеленым). **В** – Капиллярный электрофорез РНК, взаимодействующих с Fc-RPL22La и Fc-RPL22L1b. **Г** – Диаграмма Венна, иллюстрирующая количества молекул РНК, связавшихся с Fc-RPL22L1a (синим), Fc-RPL22L1b (красным) или контрольным белком (зеленым).

В заключении, мы определили, как оверэкспрессия RPL22L1a и RPL22L1b влияет на транскриптом и протеом клеток GBM. РНК-секвенирование и последующий GSVA-анализ (*Gene Set Variation Analysis*) выявили участие RPL22L1a в активации сигнального пути белка p53 (**рис. 39А**). Эти данные хорошо согласуются с тем фактом, что TP53 является главным регулятором транскрипционной сети, способствующей пронеурональному фенотипу, характерному для «краевых» клеток GBM [172]. Кроме того, RPL22L1a активировал пути ангиогенеза и передачи сигналов Notch, которые также характерны для клеток краевой части опухоли. В противоположность этому, RPL22L1b способствовал активации путей окислительного фосфорилирования и репарации ДНК, которые обычно гиперактивированы при агрессивном мезенхимальном фенотипе GBM, свойственном клеткам в центре опухоли.

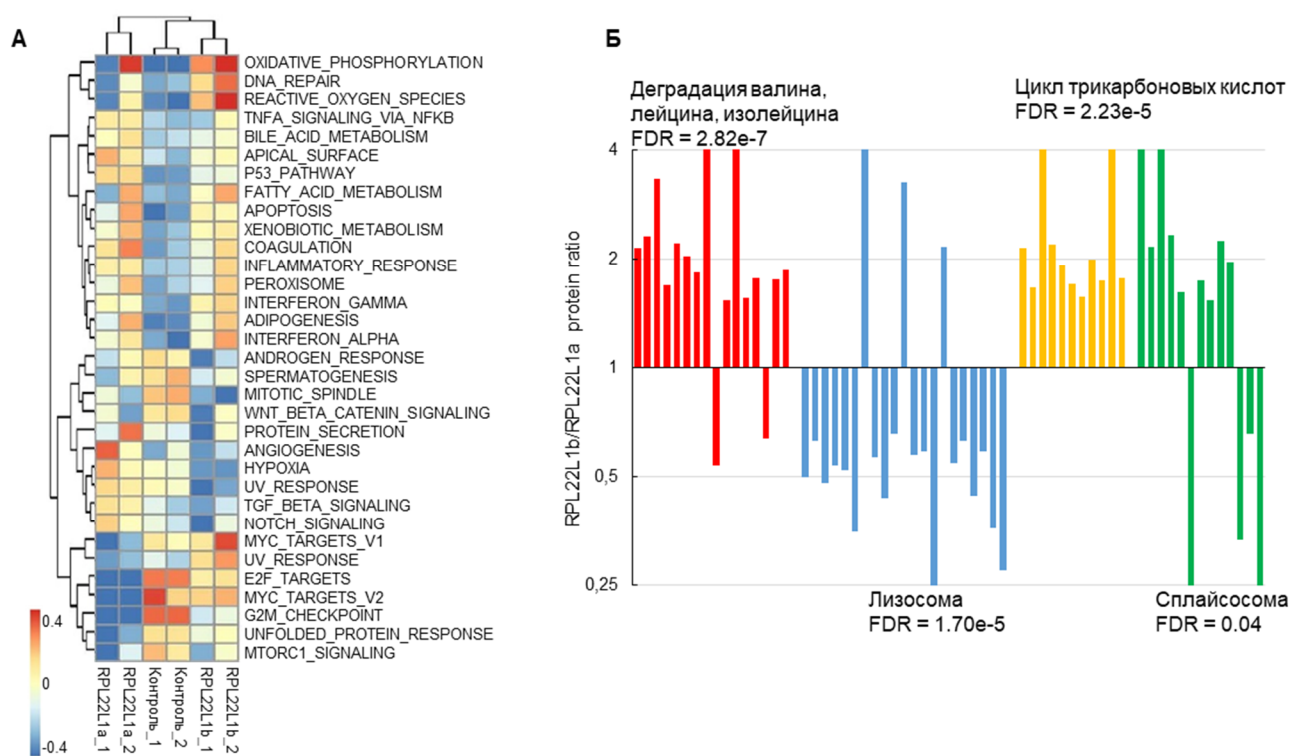


Рис. 39. **А** – Результаты GSVA-анализа данных РНК-секвенирования первичной культуры 157 GBM со сверхэкспрессией RPL22L1a, RPL22L1b или пустого вектора. **Б** – Результаты SILAC LC-MS/MS-анализа первичной культуры 157 GBM, сверхэкспрессирующей изоформы RPL22L1a или RPL22L1b. График показывает соотношение белков (в образцах с RPL22L1b против образцов с RPL22L1a), относящихся к наиболее значительно обогащенным кластерам.

Последующий количественный анализ протеома клеток 157 GBM, оверэкспрессирующих RPL22L1a или RPL22L1b с помощью SILAC LC-MS/MS-масс-спектрометрии показал, что наиболее значительные различия в представленности белков, наблюдались для путей деградации валина, лейцина и изолейцина (VLI), пути лизосомы и цикла трикарбоновых кислот (TCA) (**рис. 39Б**). Статистически значимые различия были также обнаружены для кластера сплайсосомных белков. Важно отметить, что 5 из 16 детектированных белков, участвующих в деградации VLI, принадлежали к семейству альдегиддегидрогеназ, которые важны для регуляции стволовости [173]. С другой стороны, активация цикла трикарбоновых кислот (TCA) в клетках, сверхэкспрессирующих RPL22L1b, подтверждает результаты РНК-секвенирования, поскольку TCA является основным источником метаболитов для окислительного фосфорилирования. Наконец, лизосомальный путь, активный в клетках с оверэкспрессией RPL22L1a, также связывают с дифференцировкой стволовых клеток [174].

Таким образом, мы можем утверждать, что, хотя изоформы RPL22L1 имеют идентичную N-концевую аминокислотную последовательность, их интерактомы различны. RPL22L1a взаимодействует с рибосомой и непосредственно участвует в регуляции трансляции, тогда как RPL22L1b выполняет внерибосомные функции и участвует в процессинге РНК. Интересно, что обе изоформы сильно влияют на клетки GBM: RPL22L1a активирует сигнальные пути, характерные для клеток периферии GBM, в то время как RPL22L1b связан с возникновением фенотипа, характерным для клеток центра опухоли.

4.3.4. Изучение роли RPL22L1b в регуляции сплайсинга пре-мРНК в клетках GBM.

Основываясь на полученных данных об интерактоме RPL22L1b и его внутриклеточной локализации, мы предположили, что данный белок может участвовать в регуляции сплайсинга пре-мРНК. Анализ транскриптома клеток, сверхэкспрессирующих изоформы RPL22L1, показал, что RPL22L1b действительно индуцирует значительные изменения в сплайсинге РНК (**рис. 40А**), способствуя включению экзонов и ослабляя удержание интронов, что свидетельствует о повышении эффективности работы сплайсосомного комплекса в целом [175] (**рис. 40Б**). Анализ обогащения показал, что RPL22L1b регулирует сплайсинг пре-мРНК белков репарации ДНК, а также белков, участвующих в пролиферации стволовых клеток (**рис. 40В**). Эти результаты совпадают с нашими данными о влиянии RPL22L1b на транскриптом клеток GBM (**рис. 39А**).

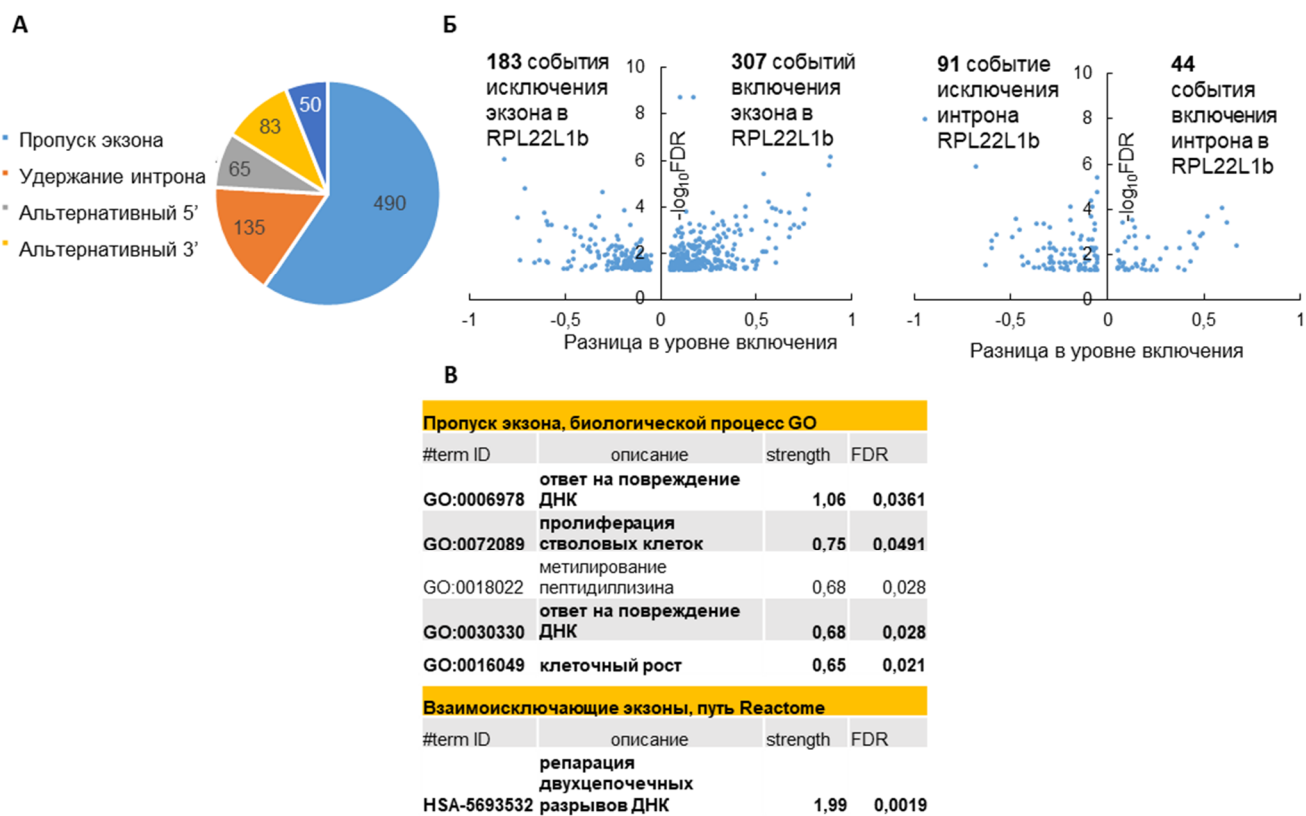


Рис. 40. **А** – Круговая диаграмма, иллюстрирующая количество и тип событий альтернативного сплайсинга в 157 клетках GBM, стабильно экспрессирующих RPL22L1b, по сравнению с контрольными клетками. **Б** – График, демонстрирующий статистически значимые события альтернативного сплайсинга, связанные с пропуском экзона (левая панель) и удержанием интрона (правая панель), обнаруженные в образцах из «А» (секвенирование проводили в двух биологических повторах). **В** – Анализ обогащения событий альтернативного сплайсинга, связанных с пропуском экзона (верхняя панель) или взаимоисключающими экзонами (нижняя панель), обнаруженных в клетка 157 GBM, стабильно экспрессирующих RPL22L1b.

Чтобы подтвердить участие RPL22L1b в регуляции сплайсинга, мы решили проанализировать влияние его оверэкспрессии на образование конкретных сплайс изоформ белков. Хотя нам удалось детектировать множество событий альтернативного сплайсинга, которые были вызваны повышением уровня RPL22L1b, функции большинства возникающих изоформ неизвестны. Тем не менее, среди обнаруженных нами транскриптов присутствовали сплайс-варианты гена MDM4, роль которых достаточно полно охарактеризована в опухолях. Известно, что в результате альтернативного сплайсинга пре-мРНК MDM4 могут образоваться две изоформы: полноразмерная MDM4-F (с включением экзона VI), которая защищает опухолевые клетки от действия терапии и стимулирует пролиферацию [176], и нефункциональная, укороченная, изоформа MDM4-S (с отсутствием VI экзона) (рис. 41А, Б). Результаты нашего эксперимента показали, что в ответ на повышение экспрессии RPL22L1b в клетках 157 GBM происходит включение VI экзона в пре-мРНК MDM4 и образование изоформы MDM4-F. Исходя из этого, мы можем заключить, что RPL22L1b действительно усиливает

включение экзонов, что в свою очередь может способствовать приобретению клетками глиобластомы более агрессивного фенотипа.

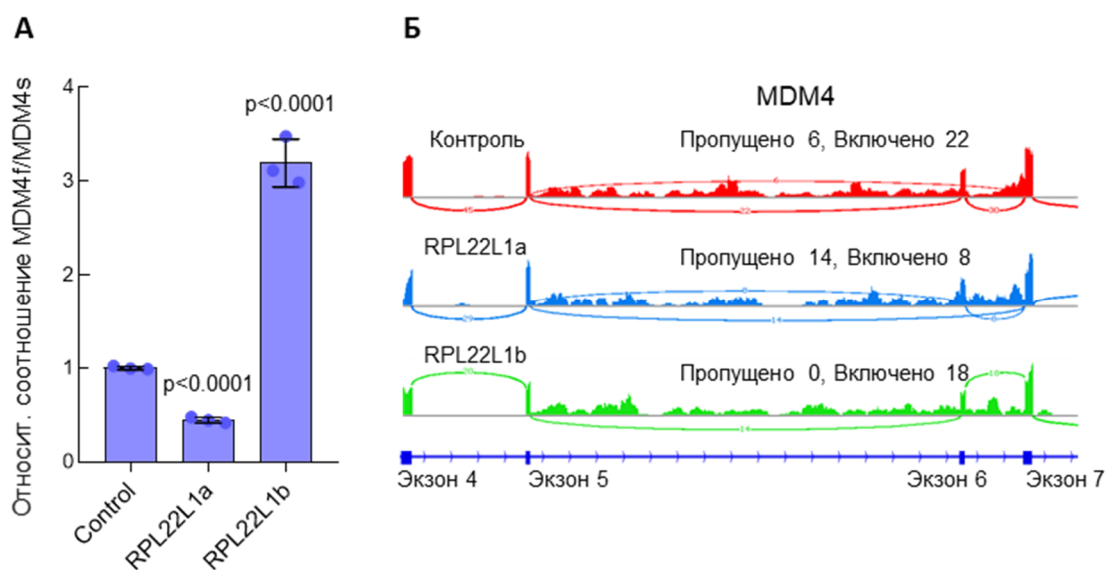


Рис. 41. *А* – Анализ соотношения экспрессии изоформ MDM4 в клетках 157 GBM, сверхэкспрессирующими RPL22L1a, RPL22L1b или пустой вектор в качестве контроля. *Б* – Графики «Сашими», демонстрирующие различия в сплайсинге MDM4 в клетках 157 GBM, сверхэкспрессирующих RPL22L1a, RPL22L1b или пустой вектор в качестве контроля. Указаны количества прочтений (ридов), относящихся к пропуску или включению экзона.

Однако, поскольку RPL22L1b не входит в состав сплайсосомы, мы предположили, что этот белок регулирует сплайсинг через некоего посредника. Основываясь на результатах анализа интерактома RPL22L1b, в качестве такого посредника мы предположили длинную некодирующую РНК MALAT1 (**рис. 42А**). Известно, что MALAT1 участвует в регуляции сплайсинга РНК и может непосредственно связываться со сплайсосомным комплексом U1 snRNP [177]. Это объясняет, почему компоненты U1 snRNP ко-преципитировали с RPL22L1b (**рис. 38А**). Чтобы определить, как взаимодействие RPL22L1b-MALAT1 влияет на клетки GBM, в первую очередь мы выделили молекулы РНК, ко-преципитировавшие с RPL22L1b, и подтвердили связывание этой изоформы с MALAT1 с помощью qRT-PCR (**рис. 42Б**). Далее мы показали, что оверэкспрессия RPL22L1b значительно снижает уровень MALAT1 в клетках (**рис. 42В**). Это позволяет предположить, что RPL22L1b индуцирует деградацию MALAT1. Для подтверждения этой гипотезы мы обработали клетки GBM, сверхэкспрессирующие изоформы RPL22L1, ингибитором транскрипции – актиномицином Д. Последующий анализ методом qRT-PCR показал, что RPL22L1b существенно снизил стабильность MALAT1 (**рис. 42Г**). Основываясь на этих результатах, мы можем заключить, что RPL22L1b влияет на сплайсинг пре-мРНК, вызывая деградацию MALAT1. Это хорошо согласуется с литературными данными, согласно которым снижение количества MALAT1 приводит к высвобождению факторов сплайсинга из ядерных

спеклов, что сопровождается активацией сплайсинга в клетках и увеличению событий включения экзона [177]. Таким образом, мы можем заключить, что деградация MALAT1 и оверэкспрессия RPL22L1b оказывают схожее воздействие на сплайсинг пре-мРНК в клетках.

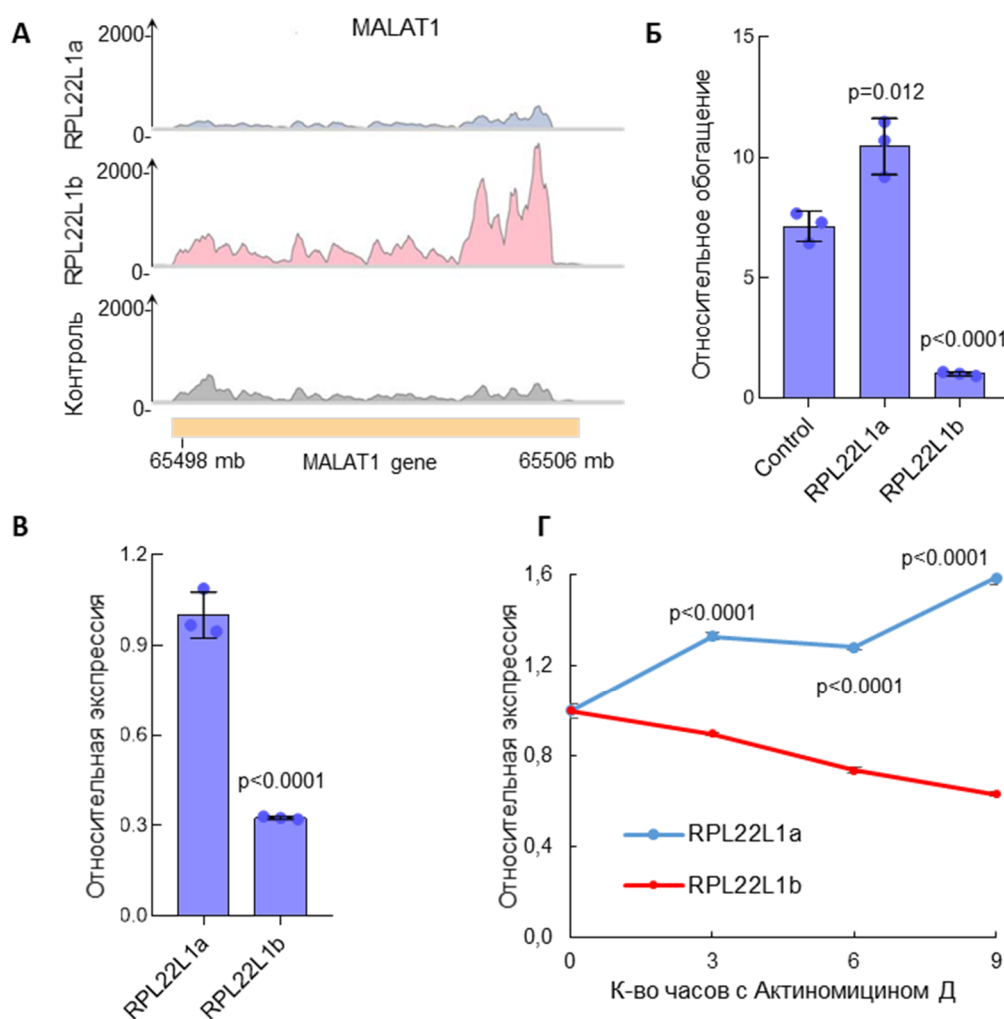


Рис. 42. *А* – Результаты РНК-секвенирования образцов клеток 157 GBM, оверэкспрессирующих Fc-RPL22L1a, Fc-RPL22L1b или Fc-меченый контрольный белок, полученных после РНК-иммунопреципитации. По оси X – выравнивание на геномную последовательность MALAT1, по оси Y – количество прочтений (ридов). *Б* – Результаты qRT-PCR с праймерами к MALAT1. Для эксперимента использовались те же образцы, что и в «А». *В* – Анализ экспрессии MALAT1 в 157 GBM, стабильно экспрессирующей различные изоформы RPL22L1. *Г* – Относительные уровни MALAT1 после добавления к клеткам с оверэкспрессией изоформ RPL22L1 актиномицина Д (10 мкг/мл).

Ранее было показано, что в клетках рака молочной железы MALAT1 снижает экспрессию белка CD133 [178]. Поскольку CD133 является ключевым маркером стволовых клеток GBM, на следующем этапе мы исследовали взаимосвязь между присутствием изоформ RPL22L1 и фенотипом GBM. Для этого мы использовали проточную цитометрию и окрашивание клеток

антителами к CD133, (**рис. 43А**), а также qRT-PCR (**рис. 43Б**) с праймерами к ряду маркеров стволовости. Мы обнаружили, что действительно RPL22L1b усиливает экспрессию CD133, а также других маркеров раковых стволовых клеток: ALDH1A3, Nanog и Oct4. Интересно, что обе изоформы RPL22L1 снижали экспрессию GFAP, характерного для более дифференцированных клеток GBM, однако эффект RPL22L1b был более выраженным. Наконец, проведя эксперимент по анализу формирования нейросфер, мы продемонстрировали, что в культурах GBM с гиперэкспрессией RPL22L1b заметно увеличено количество стволовых клеток (**рис. 43В**).

Таким образом, мы продемонстрировали, что RPL22L1b индуцирует деградацию MALAT1, тем самым способствуя увеличению стволовости клеток GBM.

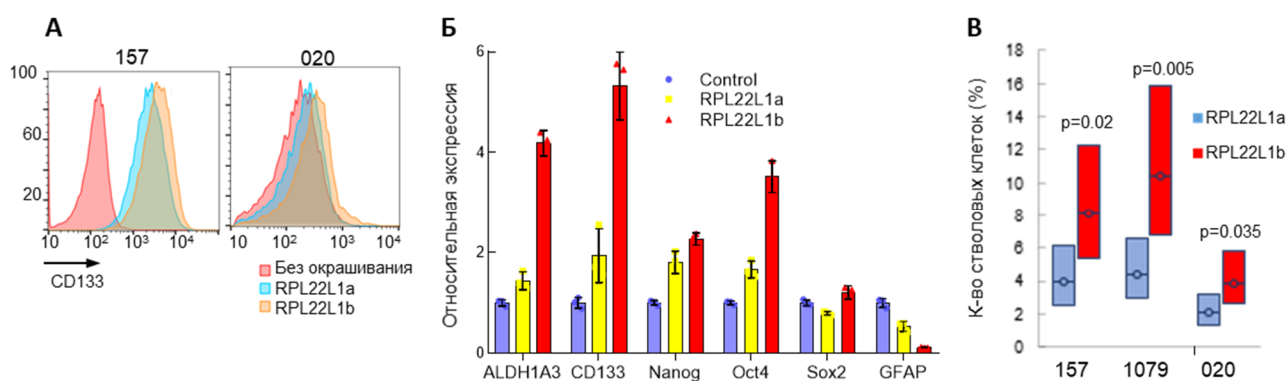


Рис. 43. *А* – Цитофлуориметрический анализ экспрессии CD133 в клетках GBM, гиперэкспрессирующих изоформ RPL22L1. *Б* – Относительное содержание мРНК ALDH1A4, CD133, Nanog, Oct4, Sox2 и GFAP в клетках с гиперэкспрессией изоформ RPL22L1 и контрольных клетках. *В* – Оценка относительного количества стволовых клеток с помощью анализа формирования нейросфер в трех первичных культурах GBM с гиперэкспрессией изоформ RPL22L1.

4.3.5. Изучение роли RPL22L1a в регуляции трансляции в клетках GBM.

Поскольку RPL22L1a является компонентом рибосомы (**рис. 38Б**), мы исследовали его роль в регуляции белкового синтеза в клетках GBM. Метаболическое мечение вновь синтезированных белков L-гомопропаргилглицином (аналогом аминокислоты метионина) и его последующая детекция с помощью клик-реакции с азидом Alexa Fluor 488, показали, что гиперэкспрессия RPL22L1a значительно увеличивает общий уровень трансляции (**рис. 44А**). Мы подтвердили эти данные для эндогенного RPL22L1a, продемонстрировав, что для первичных культур GBM, которые экспрессируют преимущественно RPL22L1a, характерен повышенный уровень синтеза белков в отличие от клеток, эндогенно экспрессирующих RPL22L1b (**рис. 44Б**). Чтобы дополнительно проверить эти результаты, мы провели фракционирование рибосом,

которое показало, что сверхэкспрессия RPL22L1a увеличивает содержание полисом, что указывает на активацию процесса трансляции (**рис. 44В**).

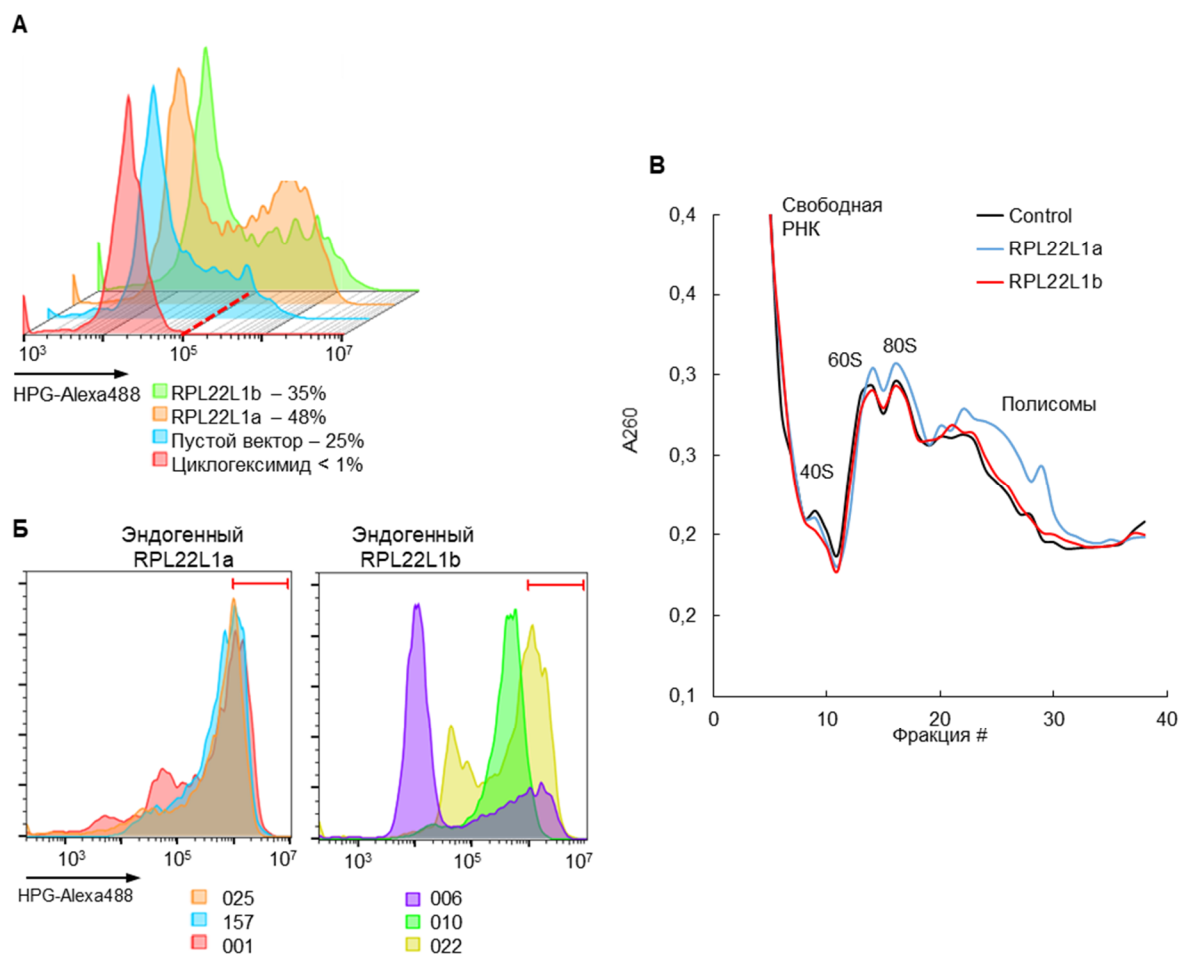


Рис. 44. *А* – Анализ включения *L*-гомопропаргилглицина во вновь синтезированные белки в первичных культурах GBM с сверхэкспрессией изоформ RPL22L1 методом проточной цитофлуориметрии. Для эксперимента использовались клетки 022 GBM, сверхэкспрессирующие RPL22L1a, RPL22L1b или пустой вектор. Отрицательным контролем служили клетки 022 GBM, которые в течение 30 минут обрабатывались циклогексимидом (100 мг/мл). *Б* – То же, но для первичных культур GBM с эндогенными изоформами RPL22L1. *В* – Полисомный профиль первичной культуры 1079 GBM с сверхэкспрессией изоформ RPL22L1.

Затем мы изучили, может ли RPL22L1a регулировать трансляцию ко-преципитировавших с ним мРНК. Среди транскриптов, ранее выделенных с RPL22L1a, мы выбрали мРНК белков, участвующих в пути p53: TP53 и CDK5, а также важных для стволовости клеток ALDH3A2 и RPN2 (**рис. 45А**). Используя qRT-PCR, мы подтвердили взаимодействие этих транскриптов с RPL22L1a, но не с RPL22L1b (**рис. 45Б**). Важно отметить, что мы не обнаружили каких-либо изменений в количестве соответствующих мРНК в клетках при сверхэкспрессии RPL22L1a или RPL22L1b (**рис. 45В**). Таким образом, можно заключить, что RPL22L1a не влияет ни на экспрессию, ни на стабильность этих транскриптов. Затем мы проверили, как изоформы RPL22L1 влияют на уровни соответствующих белков. С помощью иммуноблотинга лизатов нейрофер мы

показали, что сверхэкспрессия RPL22L1a приводит к повышению уровней белков TP53, CDK5, ALDH3A2 и RPN2 по сравнению с контрольными клетками или клетками, сверхэкспрессирующими RPL22L1b (рис. 45Г).

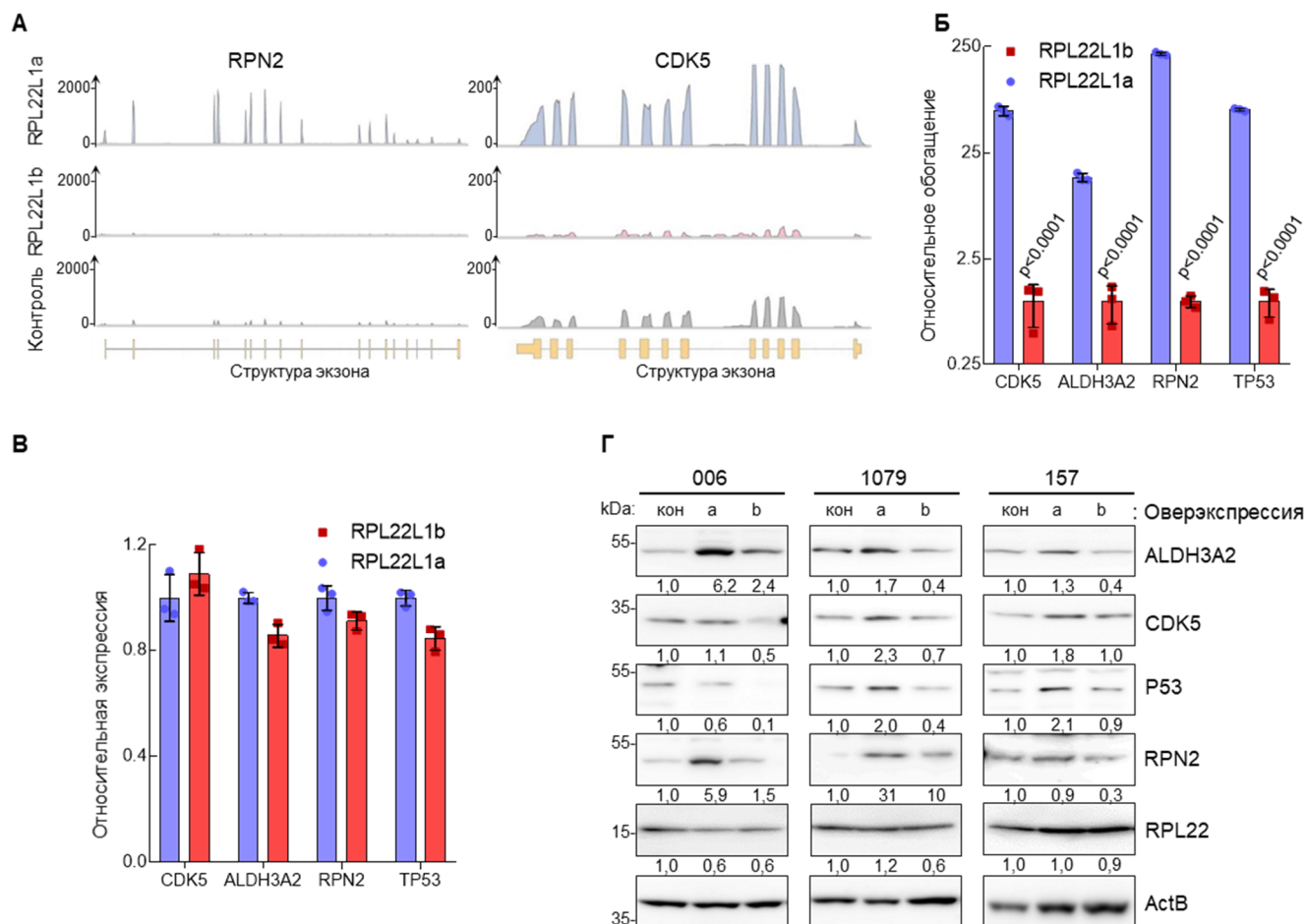


Рис. 45. **А** – Анализ обогащения мРНК TP53, CDK5, ALDH3A2 и RPN2 в образцах клеток GBM после РНК-иммунопреципитации. Для РНК-иммунопреципитации использовались клетки линии 157 GBM, сверхэкспрессирующие Fc-RPL22L1a, Fc-RPL22L1b или Fc-меченый контрольный белок. **Б** – Анализ обогащения мРНК TP53, CDK5, ALDH3A2 и RPN2 в образцах после РНК-иммунопреципитации клеток GBM, стабильно экспрессирующих Fc-RPL22L1a, Fc-RPL22L1b или Fc-меченый контрольный белок. **В** – Анализ уровней экспрессии TP53, CDK5, ALDH3A2 и RPN2 в клетках 157 GBM, стабильно экспрессирующих изоформы RPL22L1. **Г** – Детекция белков TP53, CDK5, ALDH3A2 и RPN2 методом иммуноблоттинга в клетках GBM, стабильно сверхэкспрессирующих RPL22L1a, RPL22L1b или пустой вектор (контроль).

Таким образом, наши данные показывают, что RPL22L1a может увеличивать общий уровень синтеза белка в клетках GBM, а также трансляцию специфических мРНК, которые взаимодействуют с этой изоформой.

4.4. Изучение механизмов регуляции сплайсинга пре-мРНК RPL22L1.

Далее мы исследовали механизм регуляции сплайсинга пре-мРНК RPL22L1. Анализ базы данных TCGA выявил высокую корреляцию между соотношением изоформ RPL22L1b/RPL22L1a и экспрессией фактора сплайсинга SRSF4 (**рис. 46А**). Белок SRSF4 является членом семейства SR-белков, которые участвуют и в конститутивном, и в альтернативном сплайсинге. Анализ ранее опубликованных данных iClip для SRSF4 [110] подтвердил, что этот белок связывается с пре-мРНК RPL22L1 на границе 2-го и 3-го экзонов (**рис. 46Б**) – той самой областью, которой различаются мРНК RPL22L1a и RPL22L1b (**рис. 26А**). Чтобы подтвердить эти данные, мы провели РНК-иммунопреципитацию, трансдуцировав клетки GBM лентивирусами, кодирующими Fc-SRSF4 или контрольный вектор. Результаты продемонстрировали относительно слабое, но статистически значимое обогащение мРНК RPL22L1 в образцах с Fc-SRSF4 (**рис. 46В**). Следует отметить, что мы наблюдали обогащение только для той области мРНК RPL22L1, которая соответствует 3-му экзону, включение которого предположительно регулируется SRSF4, но не для 3'UTR-области мРНК RPL22L1, которая расположена на 2000 нуклеотидов ниже соответствующего сайта сплайсинга.

Так как изоформа RPL22L1b возникает при закислении pH микроокружения, логично предположить, что в этих условиях также должна наблюдаться экспрессия SRSF4. Чтобы оценить присутствие SRSF4 в разных зонах опухоли, мы проанализировали наши данные РНК-секвенирования и продемонстрировали, что уровень SRSF4 значительно повышен в образцах из центра опухоли по сравнению с их парными образцами с периферии (**рис. 46Г**). Очень важно, что паттерн экспрессии SRSF4 выглядел почти идентичным паттерну экспрессии RPL22L1b в соответствующих образцах (**рис. 27Б**). Анализ результатов из базы данных IVY GAP дополнительно подтвердил, что самый высокий уровень мРНК SRSF4 наблюдается в областях, окружающих некротическое ядро GBM (**рис. 46Д**).

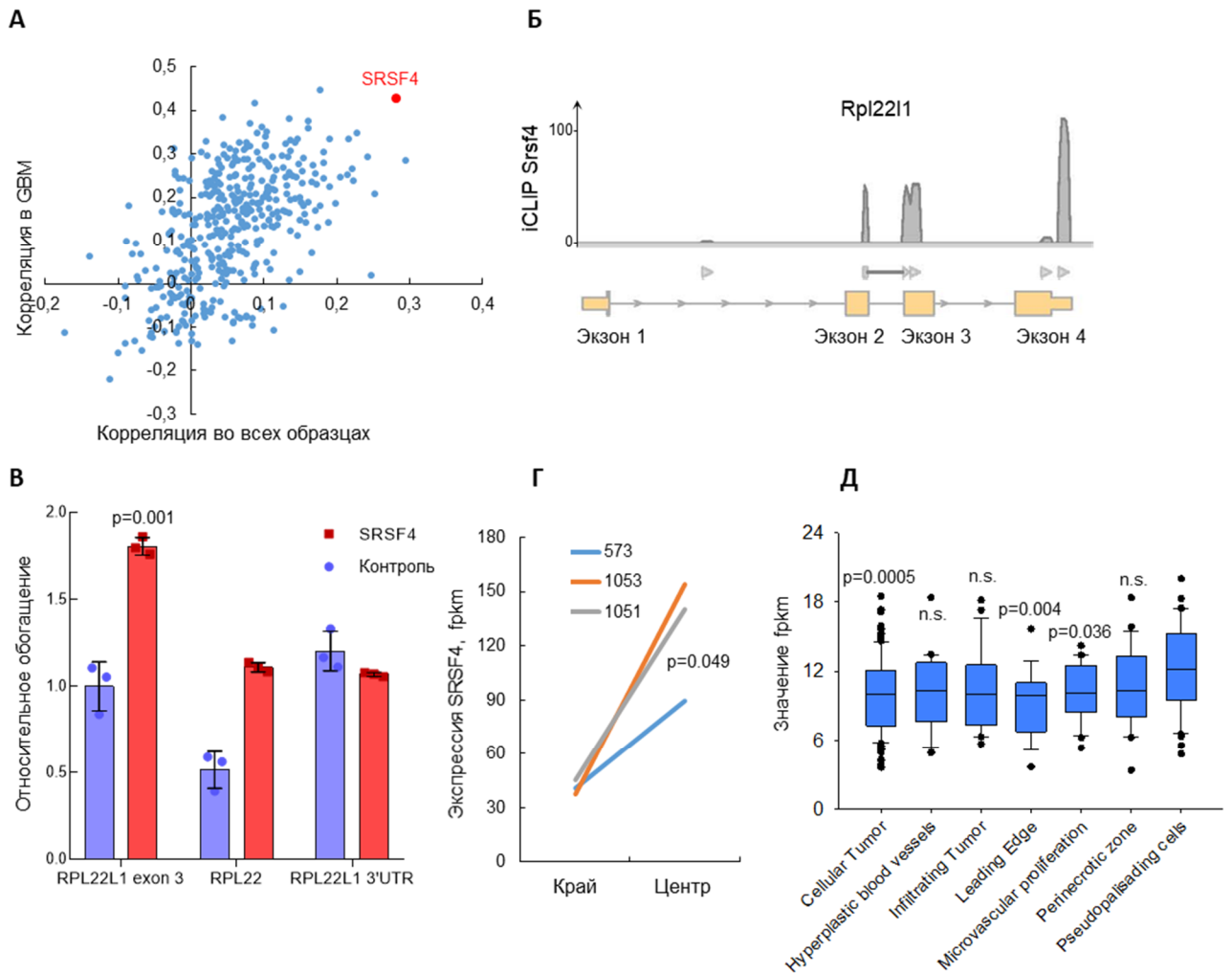


Рис. 46. А – Анализ корреляции между соотношением изоформ RPL22L1b/RPL22L1a и уровнем экспрессии различных факторов сплайсинга. Ось X показывает коэффициент корреляции для образцов всех типов рака (n = 7631), ось Y представляет коэффициент корреляции для образцов GBM (n = 154). Б – Результаты iCLIP, иллюстрирующие область связывания белка SRSF4 с пре-мРНК RPL22L1. По оси X – выравнивание результатов РНК-секвенирования на геномную последовательность RPL22L1, по оси Y – количество прочтений (ридов). Данные были получены из набора данных iCLIP E-MTAB-747. В – Результаты qRT-PCR образцов РНК, которые взаимодействовали с Fc-меченым SRSF4 (красным цветом) или контрольным белком (синим цветом), с использованием праймеров к 3-му экзону RPL22L1, 3'UTR RPL22L1 или RPL22. Г – Анализ количеств мРНК SRSF4 в парных образцах тканей GBM, выделенной из краевых и центральных областей опухолей. Д – Уровень экспрессии SRSF4 в различных областях опухоли GBM (n = 122 образца РНК, полученные от десяти разных пациентов). Данные были получены из базы данных IVY GAP. На графике отмечены медиана, первый и третий квартили.

Чтобы получить прямые доказательства того, что SRSF4 экспрессируется на уровне белка в областях GBM с закисленным микроокружением, мы провели иммуногистохимическое окрашивание тканей GBM, взятых из зон опухоли с разным внеклеточным pH. Наши данные продемонстрировали, что белок SRSF4 детектировался исключительно в кислых областях опухоли (рис. 47А). Мы подтвердили эти результаты *in vitro*, показав, что культивирование нейросфер GBM в кислой среде приводит к увеличению экспрессии SRSF4 (рис. 47Б). Чтобы

непосредственно подтвердить, что SRSF4 смещает сплайсинг пре-мРНК RPL22L1 в сторону образования RPL22L1b, мы трансфицировали клеточную линию U87MG GBM плазмидами, кодирующими белки SRSF1, SRSF2, SRSF3 и SRSF4, которые принадлежат к одному семейству факторов сплайсинга. Согласно результатам проведенной ОТ-ПЦР, все изученные белки действительно увеличивают количество транскрипта RPL22L1b, однако SRSF4 оказывал самый сильный эффект (рис. 47В). Это наблюдение было подтверждено с использованием первичных культур GBM (рис. 47Г).

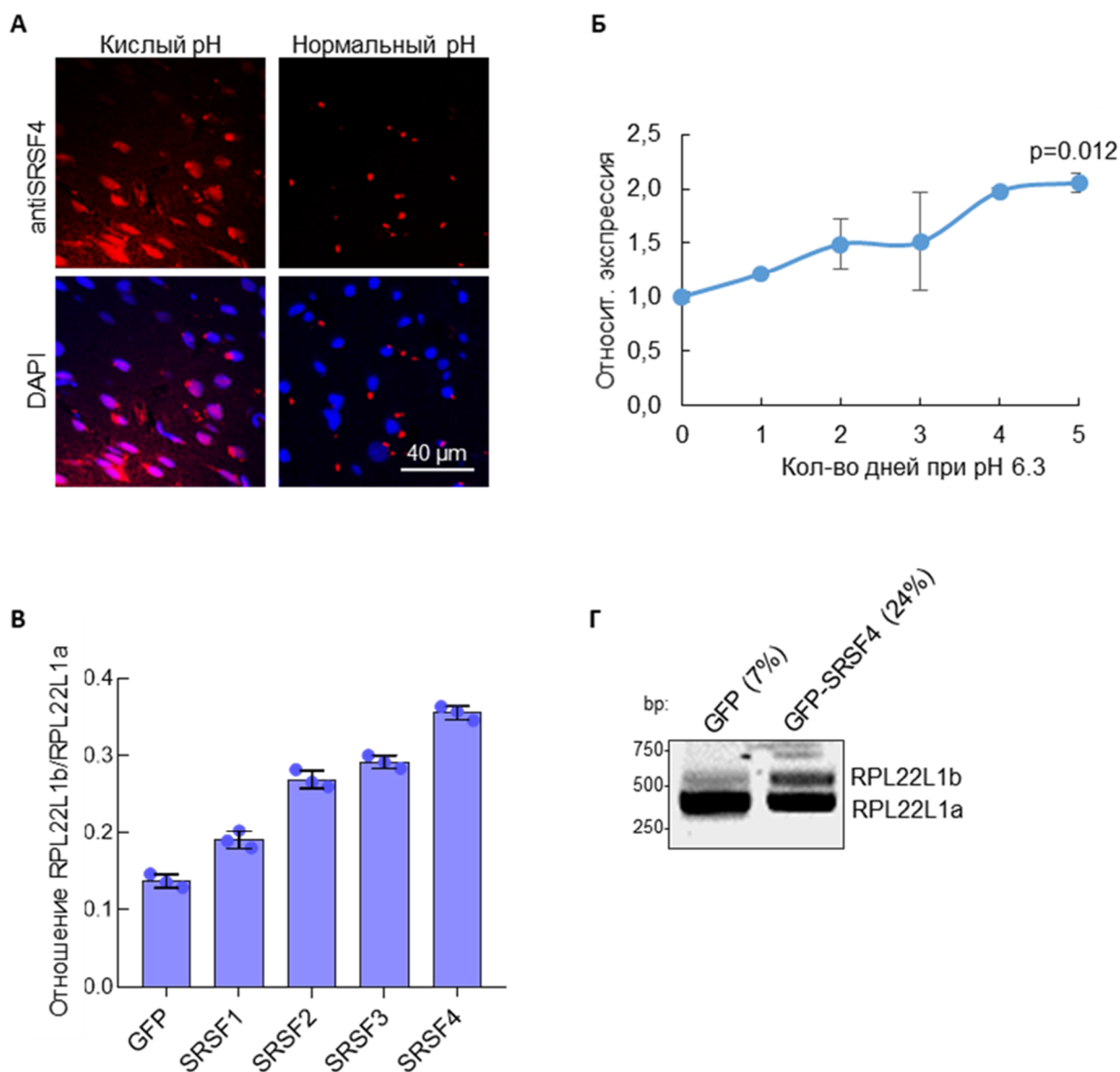


Рис. 47. *А* – Иммуногистофлуоресцентное окрашивание образцов биопсии опухоли GBM полученных из участков с низким pH и нормальным pH от одного и того же пациента с использованием антител к SRSF4 (красный) и красителя DAPI (синий). *Б* – Анализ экспрессии SRSF4 в клетках GBM, культивируемых на среде с низким pH (pH 6,0) в течение указанного количества дней. *В* – Анализ соотношения изоформ RPL22L1b/RPL22L1a в клетках U87MG, трансфицированных плазмидами, кодирующими контрольный белок (GFP) и белки SRSF1, SRSF2, SRSF3 и SRSF4. *Г* – Анализ экспрессии

изоформ RPL22L1 клетках 157 GBM, которые были трансфицированы плазидами, кодирующими GFP или GFP-SRSF4; GFP⁺ популяции были выделены на клеточном сортере.

Чтобы дополнительно подтвердить участие SRSF4 в появлении RPL22L1b, мы провели нокдаун SRSF4 в клетках GBM с подтвержденным «коровым» (006 и 030) и «краевым» (157) фенотипом (рис. 48А). Интересно, что трансдукция лентивирусами, кодирующими shSRSF4, привела к резким изменениям морфологии «коровых» клеток: они значительно увеличились в размерах и приобрели веретенообразную форму, весьма нехарактерную для GBM (рис. 48Б). Как и ожидалось, снижение экспрессии SRSF4 привело к смещению сплайсинга в сторону образования изоформы RPL22L1a (рис. 48В). В соответствии с этим наблюдением, qRT-PCR выявил снижение экспрессии стволовых маркеров CD133 и ALDH1A3 в культуре 030 клеток GBM (рис. 48Г). Важно отметить, что в клетках 157 GBM, для которых характерна очень низкая экспрессия эндогенного RPL22L1b, нокдаун SRSF4 не повлиял на количества мРНК CD133 и ALDH1A3 (рис. 48Г, нижняя панель).

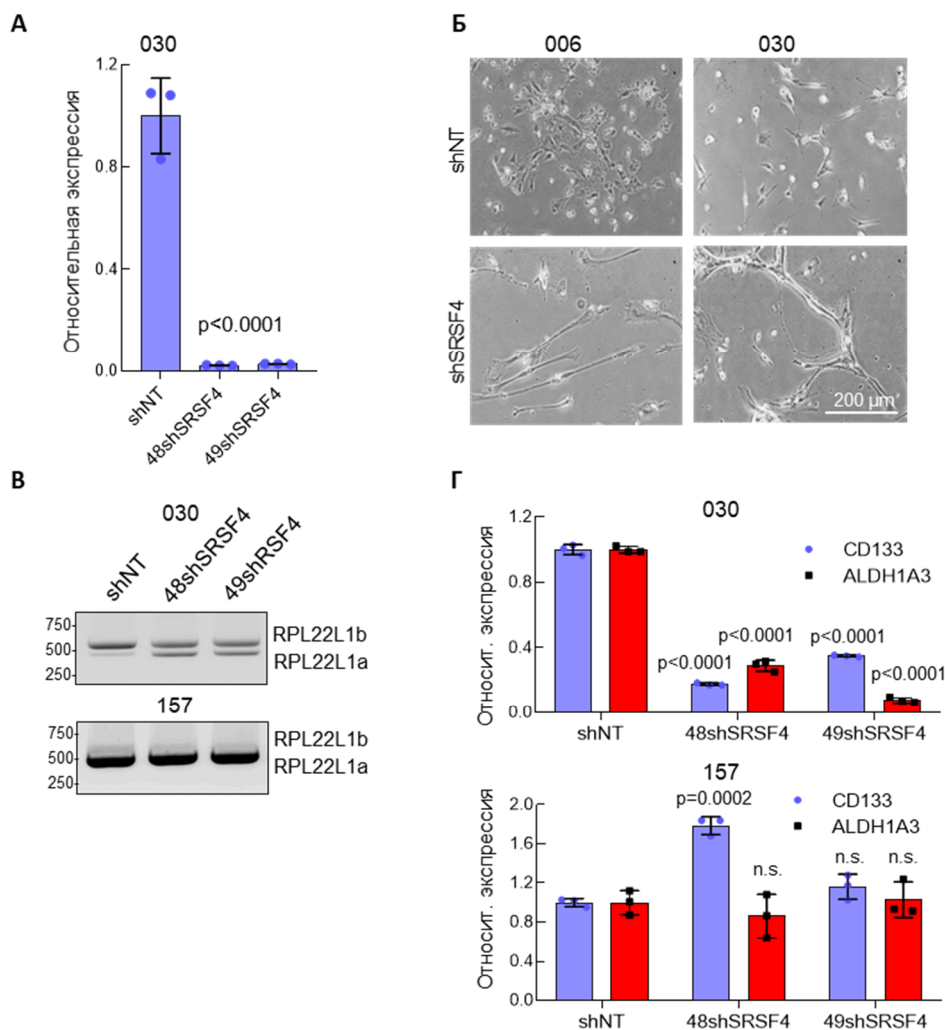


Рис. 48. А – Анализ эффективности нокдауна SRSF4 в клетках, трансдуцированных лентивирусами, кодирующими контрольную shRNA (shNT) или две разными shRNA, комплементарные

SRSF4 (48sh*SRSF4* и 49sh*SRSF4*). **Б** – Микрофотографии клеток GBM, трансдуцированных лентивирусами, кодирующими контрольную *shRNA* (*shNT*) или *shRNA*, комплементарные *SRSF4*. **В** – Анализ сплайсинга *RPL22L1* в клетках GBM, трансдуцированных лентивирусами, кодирующими контрольную *shRNA* (*shNT*) или двумя разными *shRNA*, комплементарными *SRSF4* (48sh*SRSF4* и 49sh*SRSF4*). **Г** – Анализ экспрессии *CD133* и *ALDH1A3* в 030 (верхняя панель) и 157 (нижняя панель) клетках GBM, трансдуцированных лентивирусами аналогично “В”.

Наконец, мы проверили влияние нокдауна *SRSF4* на пролиферацию клеток *in vitro*. Мы продемонстрировали, что подавление экспрессии *SRSF4* в клетках GBM с «коровым» фенотипом (030 GBM) почти полностью ингибировало их рост (рис. 49А), в то время как в клетках с «краевым» фенотипом (157 GBM) нокдаун *SRSF4* оказывал гораздо менее выраженный эффект (рис. 49Б).

Чтобы определить клиническую значимость *SRSF4*, мы оценили его влияние на выживаемость пациентов. Для этого мы разделили пациентов с глиомами из базы REMBRANDT на две группы, в зависимости от уровня экспрессии *SRSF4*, и проанализировали продолжительность их жизни. Наши результаты показали, что экспрессия *SRSF4* была связана с плохим прогнозом у пациентов с GBM и глиомами низкой степени (рис. 49В), что согласуется с данными, полученными для *RPL22L1b* (рис. 30А).

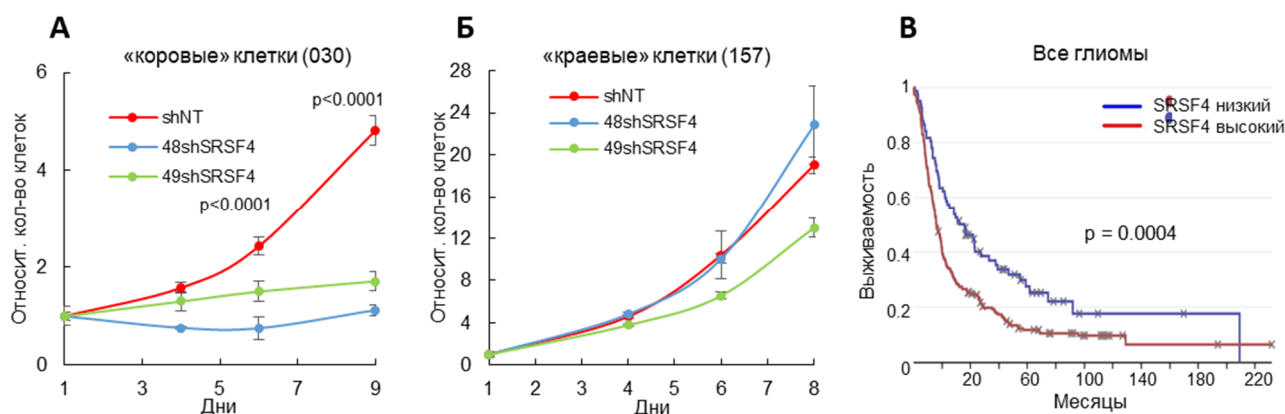


Рис. 49. **А** – Анализ пролиферации клеток *in vitro*, трансдуцированных лентивирусами, кодирующими контрольную *shRNA* (*shNT*) или двумя разными *shRNA*, комплементарными *SRSF4* (48sh*SRSF4* и 49sh*SRSF4*). **Б** – Кривая Каплана-Майера, показывающая общую выживаемость пациентов с глиомой в зависимости от уровня экспрессии *SRSF4*.

Таким образом, мы показали, что закисление микроокружения в центральной части GBM способствует увеличению экспрессии *SRSF4*, что, в свою очередь, переключает сплайсинг пре-мРНК *RPL22L1* в сторону *RPL22L1b*. Эта изоформа важна для поддержания стволовости клеток GBM с «коровым» фенотипом.

4.5. Исследование действия нового низкомолекулярного ингибитора Clk-киназ на сплайсинг пре-мРНК RPL22L1.

В заключение мы решили определить, может ли фармакологическое ингибирование SRSF4 изменять сплайсинг RPL22L1, и таким образом оказывать противоопухолевый эффект. В настоящее время не обнаружено ингибиторов, действующих непосредственно на представителей семейства SRSF. Однако повлиять на их функционирование можно за счет ингибирования активности протеинкиназ, участвующих в фосфорилировании SR-белков. К таким киназам относятся семейства CDC-подобных киназ (Clk) и NIMA-родственных киназ 2 (Nek2). Достоверно известно, что Clk-киназы участвуют в регуляции активности SR-белков посредством фосфорилирования остатков серина в их RS-домене [94]. В частности, фосфорилирование Clk1-киназой необходимо для высвобождения SR-белков из ядерных спеклов и привлечения их к участию в сплайсинге [95]. Киназа Nek2 изначально была описана в качестве регулятора процесса расхождения центросом во время митоза, однако более поздние исследования указывают на то, что она также может фосфорилировать SR-белки и таким образом регулировать их активность [179, 180].

На основании этих литературных данных нами были выбраны несколько веществ, которые оказывают влияние на сплайсинг: CMP3a (высокоспецифичный ингибитор киназы Nek2); соединения EY404 (Ey) и FG1059 (Fg) (двойные ингибиторы киназ Clk1/4, представляющие собой структурные аналоги, отличающиеся наличием амино- или нитрогруппы соответственно); пладениолиз Б (Pl-B) (блокирует активность спласосомы, напрямую связываясь с белком SF3b1). Оценив воздействие этих соединений на сплайсинг пре-мРНК RPL22L1, мы обнаружили, что Fg1059 приводит к наиболее значительным изменениям (**рис. 50А, Б**). Этот результат был подтвержден с использованием трех первичных культур GBM. С помощью секвенирования по Сэнгеру мы установили, что под действием Fg1059 в образующемся транскрипте происходит полный пропуск третьего экзона – именно того, которым различаются изоформы RPL22L1a и RPL22L1b (**рис. 50В**).

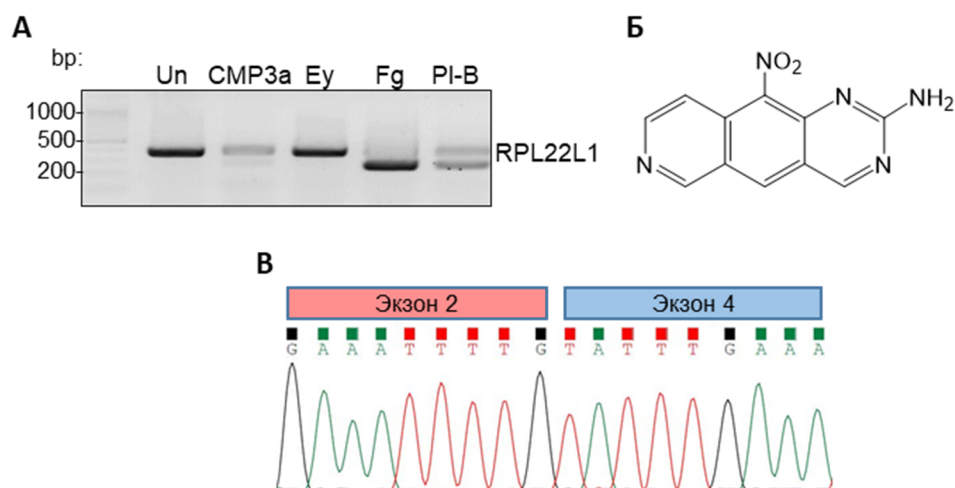
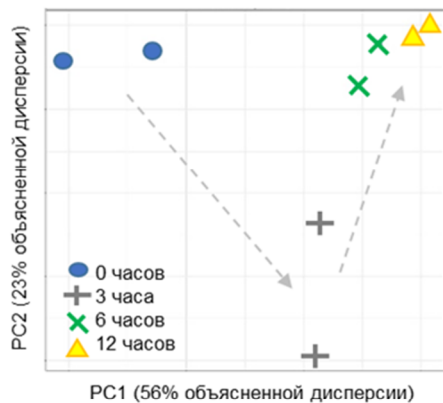


Рис. 50. *А* – Анализ экспрессии изоформ RPL22L1 в первичных культурах GBM, которые не обрабатывались веществами (Un) или обрабатывались в течение 24 часов соединениями: CMP3a (ингибитор киназы Nek2); EY404 (Ey) и FG1059 (Fg); ингибитором сплайсинга пладиенолидом Б (PI-B). *Б* – Структурная формула Fg1059. *В* – Результаты секвенирования по Сэнгеру изоформы RPL22L1, образующейся после обработки клеток FG1059.

Чтобы подтвердить, что изменения сплайсинга RPL22L1 вызваны нарушениями в фосфорилировании SRSF4, мы изучили фосфопротеом нейросфер GBM, обработанных FG1059 в течение 0, 3, 6 и 12 часов. LC-МС/МС-масс-спектрометрия выделенных фосфопептидов и последующий анализ полученных данных методом главных компонент (PCA) показали, что наиболее значительные различия в уровнях фосфорилирования белков наблюдались через 3 часа после добавления Fg1059 (**рис. 51А**). Этот результат вполне ожидаем, поскольку на раннем этапе мы, вероятно, наблюдаем прямой эффект действия FG1059, в то время как более длительная инкубация может приводить к активации компенсаторных сигнальных путей и апоптотических каскадов. Далее мы провели анализ обогащения белков, на фосфорилирование которых влияет FG1059. Наши результаты показали, что через 3 часа наиболее значительные различия наблюдались для путей процессинга и сплайсинга пре-мРНК и затрагивали белки, содержащие мотив распознавания РНК (включая белок SRSF4) (**рис. 51Б**). Интересно, что при 12-ти часовой инкубации мы наблюдали обогащение по путям Rho-ГТФаз и белкам, содержащим РН-подобные домены, которые важны для многих клеточных процессов, таких как пролиферация, инвазия и секреция веществ [181]. Таким образом, эти результаты указывают на то, что основным процессом, на который воздействует FG1059, действительно является сплайсинг пре-мРНК, а SRSF4 представляет собой одну из его мишеней.

А



Б

0 часов vs 3 часа Путь Reactome			0 часов vs 3 часа Белковые домены и свойства		
#term ID	Описание	FDR	#term ID	Описание	FDR
HSA72203	Процессинг кэпированной пре-мРНК, содержащей интроны	0.0001	IPR000504	Домен распознавания РНК	0.0299
HSA449147	Интерликиновый сигналинг	0.0006	IPR008936	Белок-активатор Rho ГТФаз	0.0299
HSA8953854	Метаболизм РНК	0.0011	IPR011993	РН-подобный домен	0.0299
HSA72163	Сплайсинг мРНК	0.0022	IPR012677	Нуклеотид-связывающий альфа/бета-складчатый домен	0.0299
HSA1280215	Цитокиновый сигналинг	0.0022	IPR035979	РНК-связывающий домен	0.0299

0 часов vs 12 часов Путь Reactome			0 hours vs 12 hours Protein Domains and Features		
#term ID	Описание	FDR	#term ID	Описание	FDR
HSA194315	Сигналинг Rho ГТФазами	0.0059	IPR011993	PH-like domain superfamily	3.3E-05
HSA2990846	Сумоилирование	0.0111	IPR001478	PDZ domain	0.0003
HSA194840	Цикл Rho ГТФаз	0.0140	IPR036034	PDZ superfamily	0.0003
HSA199991	Мембранный транспорт	0.0140	IPR000504	RNA recognition motif domain	0.0068
HSA3700989	Регуляция транскрипции с помощью TP53	0.0140	IPR001965	Zinc finger, PHD-type	0.0068

Рис. 51. А – Анализ методом главных компонент фосфопротеомных данных, полученных с помощью LC-MS/MS-масс-спектрометрии фосфопептидов, выделенных из клеток 157 GBM, обработанных 3 мкМ FG1059 в течение 0, 3, 6 и 12 часов. **Б** – Анализ обогащения белков, которые были дифференцированно фосфорилированы (различия более чем в 10 раз) в клетках GBM после 3 (верхняя панель) или 12 (нижняя панель) часов инкубации с 3 мкМ FG1059 по сравнению с необработанными клетками.

Так как Clk-киназы контролируют активность SRSF-белков за счет регуляции их внутриклеточной локализации, мы изучили влияние FG1059 на распределение SRSF4 внутри клетки. Для этого мы трансфицировали клетки U87MG плазмидой, кодирующей фьюжен-белок RFP-SRSF4, и обнаружили, что обработка FG1059 вызывает транслокацию SRSF4 из ядра в цитоплазму, тем самым ингибируя связанную со сплайсингом активность SRSF4 (**рис. 52**).

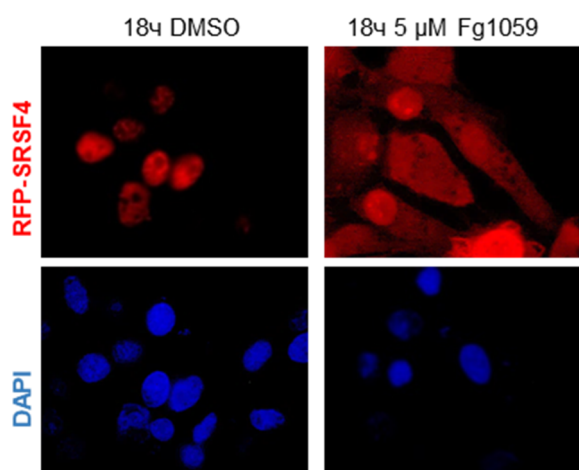


Рис. 52. Флуоресцентные микрофотографии клеток GBM, трансфицированных плазмидой, кодирующей RFP-SRSF4, и впоследствии обработанных 5 мкМ FG1059 в течение 18 часов. ДНК окрашивали DAPI.

Затем мы проверили влияние FG1059 на жизнеспособность первичных культур GBM и нормальных астроцитов человека *in vitro*. FG1059 убивал клетки GBM с $IC_{50} < 500$ нМ, тогда как его цитотоксичность в отношении нормальных астроцитов была заметно ниже (**рис. 53**). Интересно, что клетки, экспрессирующие эндогенный RPL22L1b, оказались более устойчивыми к FG1059, чем клетки, экспрессирующие изоформу RPL22L1a. Это наблюдение хорошо согласуется с данными, представленными на **рисунке 40**, где мы продемонстрировали, что RPL22L1b, но не RPL22L1a повышает эффективность сплайсинга. Следовательно, разумно предположить, что RPL22L1b лучше защищает клетки GBM от действия FG1059, который нарушает сплайсинг РНК.

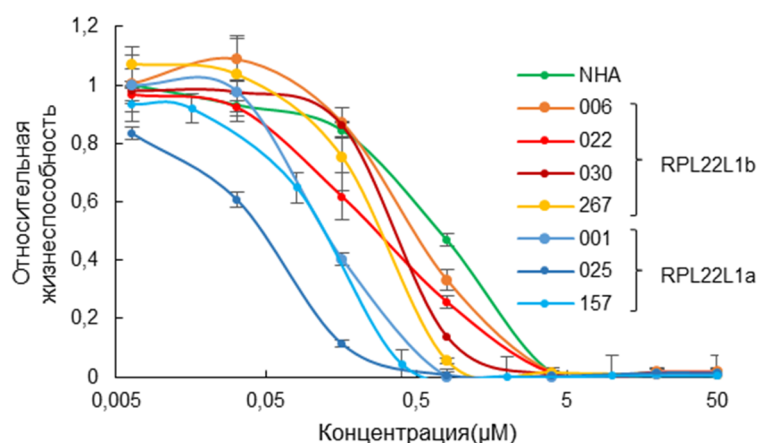


Рис. 53. – *In vitro* анализ жизнеспособности клеток GBM и нормальных астроцитов человека (NHA), которые обрабатывались различной концентрацией FG1059 в течение 5 дней. Указаны клетки, преимущественно экспрессирующие изоформу RPL22L1a (001, 025, 157) и RPL22L1b (006, 022, 030, 267).

Ранее в нашей лаборатории было установлено, что ингибиторы сплайсинга, применяемые в сублетальных концентрациях, могут значительно повысить эффективность обычных противоопухолевых препаратов [182]. Поэтому мы изучили возможное взаимное усиление действия FG1059 и темозоломида – основного химиотерапевтического препарата, используемого для лечения пациентов с GBM (**рис. 54А**). Согласно нашим данным, FG1059 снижал жизнеспособность клеток GBM, обработанных темозоломидом, почти в два раза. Аналогичные результаты были получены, когда FG1059 применяли вместе с пладиенолидом Б (**рис. 54Б**). Таким образом, соединение Fg1059 потенциально может использоваться в комбинации с этими препаратами для лечения GBM.

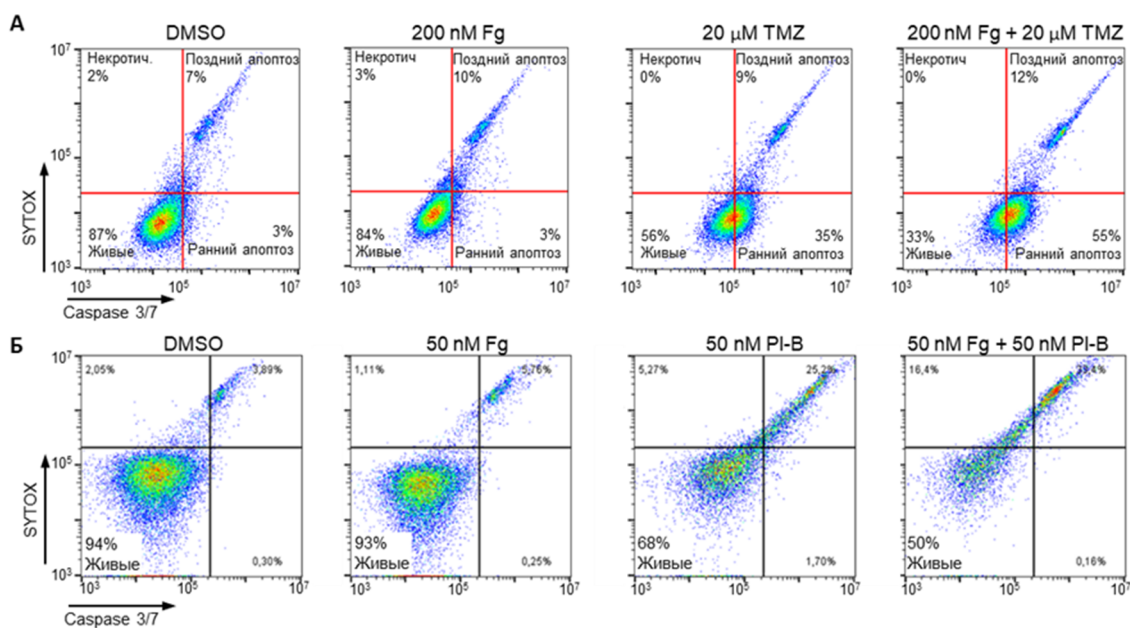


Рис. 54. *А* – FACS-анализ активности каспазы 3/7 и окрашивание SYTOX клеток 157 GBM, обработанных DMSO; 0,2 мкМ FG1059; 20 мкМ TMZ или обоими соединениями одновременно в течение 24 часов. *Б* – FACS-анализ активности каспазы 3/7 и окрашивание SYTOX клеток 157 GBM, обработанных DMSO; 50 нМ FG1059; 50 нМ FG1059; 50 нМ Пладиенолидом Б или обоими соединениями одновременно в течение 24 часов.

Наконец, в заключении мы оценили противоопухолевую эффективность FG1059 *in vivo*, используя иммунодефицитных мышей, в мозг которых вводили полученные от пациента клетки GBM. Согласно нашим данным, последующая внутрибрюшинная инъекция FG1059 существенно уменьшала процент пролиферирующих клеток (оценивался по интенсивности окраски на Ki67⁺) и стволовых клеток глиомы (оценивался по интенсивности окраски на ALDH1A3⁺) в опухоли (рис. 55А, Б и В). Кроме того, введение FG1059 в течение 15 дней статистически значимо продлевало жизнь животных (рис. 55Г).

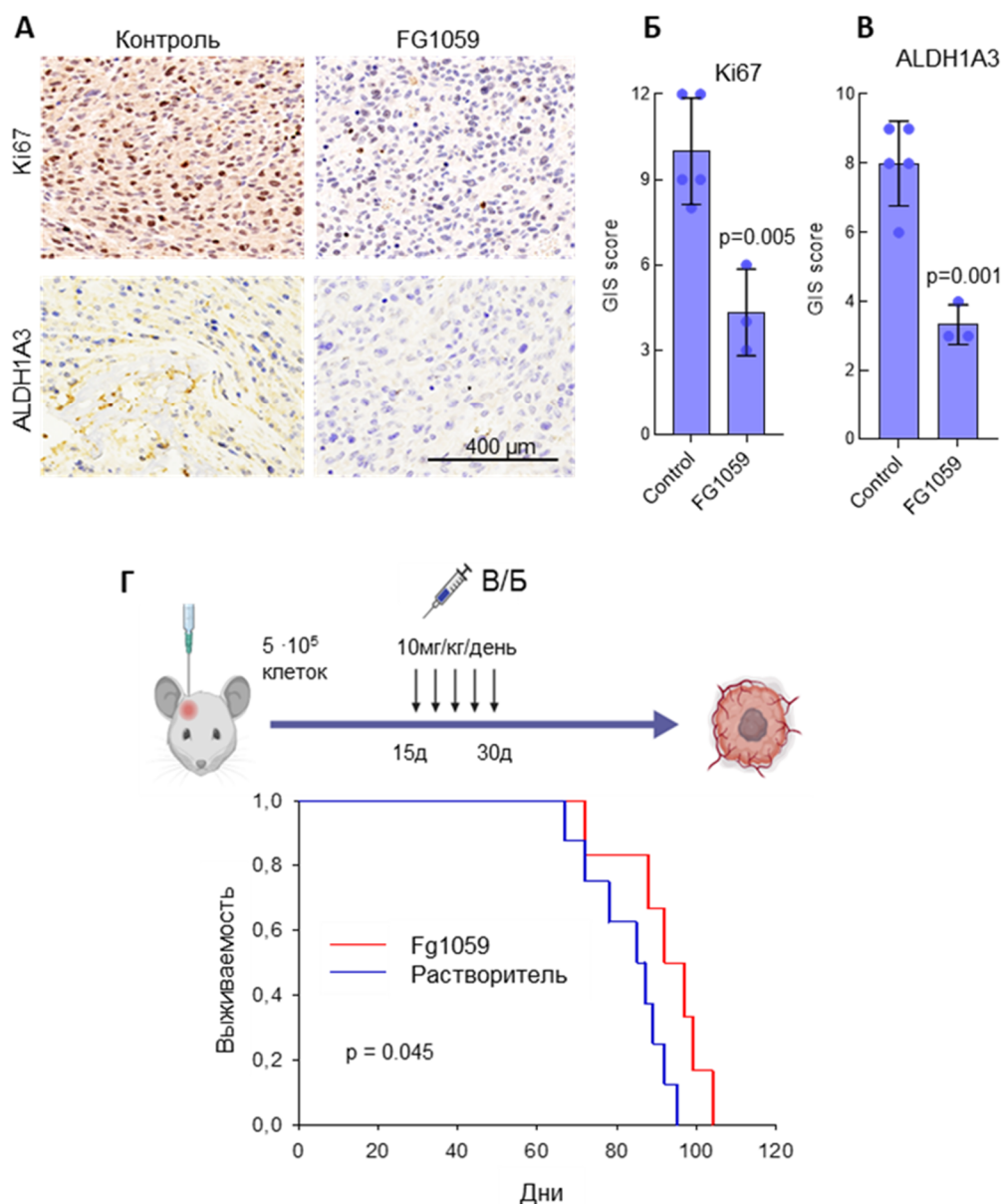


Рис. 55. *A* – Иммуногистохимическое окрашивание срезов ксенотрансплантантных опухолей с антителами к Ki67 и ALDH1A3. *Б* – Количественное определение иммуногистохимического окрашивания на Ki67 образцов из «А» (проводилось с помощью German immunohistochemical scoring system). *n* = 5 мышей в контрольной группе и *n* = 3 мыши в группе, получавшей FG1059. *В* – Количественное определение иммуногистохимического окрашивания на ALDH1A3 аналогично «Б». *Г* – Кривые Каплана-Майера, демонстрирующие выживаемость иммунодефицитных мышей, в мозг которым были трансплантированы клетки GBM человека; через месяц после трансплантации мышам в течение 15 дней вводили Fg1059 или растворитель.

Суммарно, полученные данные демонстрируют, что FG1059 ингибирует фосфорилирование SRSF4, нарушает сплайсинг пре-мРНК RPL22L1 и, в конечном счете, ослабляет рост GBM как *in vitro*, так и *in vivo*. Однако следует отметить, что FG1059, скорее всего, воздействует на широкий спектр нижестоящих мишеней, и только часть его эффекта вызвана действием RPL22L1.

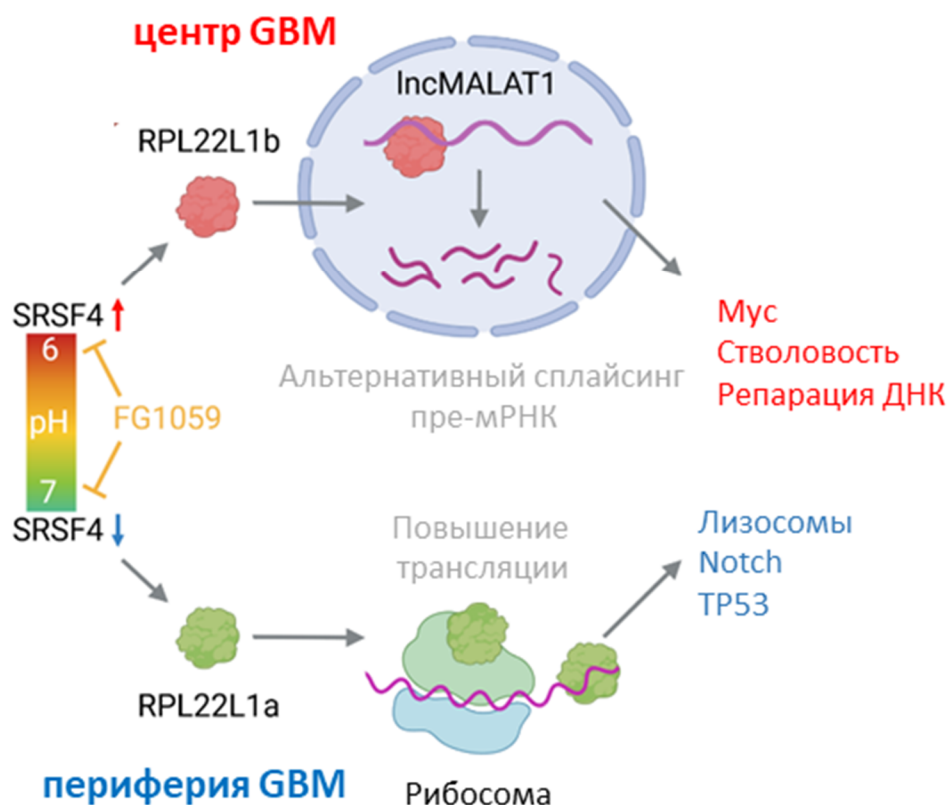


Рис. 56. Иллюстрация предлагаемого молекулярного механизма регуляции пространственного фенотипа клеток глиобластомы изоформами RPL22L1 [183].

Суммируя все данные, полученные в нашей работе, можно предположить новый молекулярный механизм возникновения внутриопухолевой гетерогенности GBM (рис. 56). Движущей силой этого процесса служит закисление центральной зоны опухоли, которое происходит во время роста GBM. Оно усиливает экспрессию фактора сплайсинга SRSF4, который переключает сплайсинг пре-мРНК рибосомного белка RPL22L1 в сторону образования изоформы RPL22L1b. Эта изоформа не может связываться с рибосомой из-за измененной структуры С-конца, хотя N-концевая часть сохраняет способность взаимодействовать с молекулами РНК. RPL22L1b вызывает деградацию длинной некодирующей РНК MALAT1. Уменьшение уровня MALAT1, а также вызванные отсутствием RPL22L1a изоформы снижение интенсивности трансляции и понижение количества TP53, провоцируют более агрессивный фенотип GBM, характерный для клеток в ядре опухоли. В результате, в разных областях глиобластомы возникают фенотипически различные популяции клеток GBM, которые в конечном итоге увеличивают гетерогенность GBM и способствуют агрессивности опухоли.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ.

Глиобластома является одной из наиболее агрессивных опухолей головного мозга. В то время как для многих видов рака уже разработана эффективная противоопухолевая терапия, для глиобластомы, несмотря на десятилетия исследований, по-прежнему не существует действенных методов лечения. Одной из причин многолетних неудач является высокая внутриопухолевая гетерогенность клеток GBM, которая проявляется на самых разных уровнях: транскриптомном, протеомном, эпигенетическом, метаболомном и др. Именно благодаря присутствию различающихся по свойствам клеток, опухоль может успешно сопротивляться действию практических любых вариантов лечения. Однако, несмотря на важность изучения гетерогенности GBM, конкретные механизмы, приводящие к ее возникновению, все еще неизвестны.

В первой части данной работы мы показали, что и транскриптом, и протеом клеток GBM, населяющих разные зоны опухоли, различаются. Однако, вопреки ожиданиям, обнаруженная разница в транскриптоме не совпадала с таковой для протеома. В процессе поиска причин этих несоответствий мы обнаружили, что клетки GBM из разных зон, имеют различный белковый состав рибосом. Это явление может объяснять наблюдаемое несоответствие транскриптома и протеома, так как присутствие в рибосомах тех или иных RPs изменяет эффективность трансляции мРНК и за счет этого влияет на набор клеточных белков. Интересно, что согласно полученным нами данным, изменения в белковом составе рибосом были вызваны не разницей в уровнях экспрессии генов RPs, а альтернативным сплайсингом их пре-мРНК. Это крайне важное наблюдение, так как до сих пор исследования альтернативного сплайсинга рибосомных белков и возникающих сплайс-вариантов RPs фактически не проводились.

Нам удалось обнаружить, что в результате альтернативного сплайсинга пре-мРНК RPL22L1 образуются две изоформы: RPL22L1a и RPL22L1b – последняя из которых впервые описана в данной работе. Мы продемонстрировали, что мРНК обеих изоформ RPL22L1 присутствуют во многих нормальных тканях человека, а также первичных культурах GBM. Мы подтвердили трансляцию обеих изоформ RPL22L1 и детектировали присутствие каждого белка в стандартных раковых клеточных линиях, а также в первичных культурах GBM. Интересно, что изоформы RPL22L1 имели разную внутриклеточную локализацию: RPL22L1a находилась в цитоплазме, а RPL22L1b – в ядре, что свидетельствует о различиях их функций. Мы также обнаружили, что RPL22L1a присутствует в клетках, культивируемых при нормальных условиях, а изоформа RPL22L1b появляется в ответ на закисление внеклеточной среды. Мы подтвердили эти данные на первичных культурах *in vitro*, и, что очень важно, на образцах тканей GBM пациентов. Для получения этих образцов GBM мы использовали новейший метод pH-

взвешенной молекулярной МРТ, которая позволила отобрать биопсии из зон опухоли с разным внеклеточным рН и в дальнейшем подтвердить присутствие в них соответствующих изоформ RPL22L1.

Третья часть нашей работы была посвящена подробному исследованию функций изоформ RPL22L1. Согласно полученным данным, RPL22L1a является компонентом рибосомы и увеличивает общий уровень трансляции в клетках, а также трансляцию тех мРНК, которые взаимодействуют с этим белком. RPL22L1b, напротив, не входит в состав рибосомы, а принимает участие в регуляции сплайсинга РНК. Наши данные указывают на то, что это происходит благодаря тому, что RPL22L1b вызывает деградацию MALAT1, которая является важным негативным регулятором сплайсинга. В результате снижения уровня MALAT1, RPL22L1b способствует повышению стволовости клеток глиобластомы.

В четвертой части работы мы установили, что в регуляции сплайсинга пре-мРНК RPL22L1 принимает участие белок SRSF4. Мы показали, что закисление микроокружения, характерное для центральной части GBM, способствует экспрессии SRSF4, который меняет сплайсинг пре-мРНК RPL22L1 в сторону образования изоформы RPL22L1b. Эти результаты были подтверждены как на первичных линиях GBM, так и на образцах тканей GBM, полученных из разных зон опухоли. Мы показали, что SRSF4 связывается с пре-мРНК RPL22L1 на границе второго и третьего экзона – именно того участка, которым различаются изоформы RPL22L1. Также мы обнаружили, что нокдаун SRSF4 сильно изменял фенотип «коровых» клеток GBM и фактически полностью ингибировал их пролиферацию.

Наконец, мы обнаружили вещество Fg1059, которое влияет на сплайсинг пре-мРНК RPL22L1. Fg1059 является ингибитором киназ Clk1/4, принимающих участие в фосфорилировании факторов сплайсинга семейства SRSF. С помощью анализа фосфопротеома клеток глиобластомы мы показали, что обработка Fg1059 понижает уровень фосфорилирования белков, вовлечённых в регуляцию процессинга и сплайсинга пре-мРНК включая белок SRSF4. В соответствии с этим, после добавления к клеткам GBM Fg1059 происходило нарушение сплайсинга пре-мРНК RPL22L1, которое в свою очередь приводило к ослаблению роста GBM как *in vitro*, так и *in vivo*.

В заключение, полагаясь на полученные в данной работе результаты, мы предложили новый механизм формирования внутриопухолевой гетерогенности GBM, который связан с закислением микроокружения в процессе роста опухоли и возникновением изоформы RPL22L1b, способствующей поддержанию более агрессивного мезенхимального фенотипа клеток глиобластомы.

ВЫВОДЫ.

1. Рибосомы клеток GBM, находящихся на периферии и в центральной части опухоли, различаются по составу белков.
2. Обнаружена новая изоформа рибосомного белка RPL22L1b.
3. В регуляции сплайсинга пре-мРНК RPL22L1 задействован белок SRSF4.
4. Тип сплайсинга пре-мРНК RPL22L1 зависит от внеклеточного pH и коррелирует с выживаемостью пациентов.
5. Изоформа RPL22L1a экспрессируется в клетках GBM, расположенных на периферии опухоли. Изоформа RPL22L1b характерна для клеток центральной части GBM и способствует их более агрессивному фенотипу.
6. Экспрессия RPL22L1a влечет повышение общего уровня трансляции, а также усиливает трансляцию отдельных мРНК, непосредственно взаимодействующих с этим белком.
7. Экспрессия RPL22L1b влияет на сплайсинг в клетках GBM за счет деградации длинной некодирующей РНК MALAT1.
8. Обнаружен новый низкомолекулярный ингибитор сплайсинга RPL22L1, замедляющий рост опухоли *in vitro* и *in vivo*.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ:

1. van Linde M.E., Brahm C.G., de Witt Hamer P.C., et al. Treatment outcome of patients with recurrent glioblastoma multiforme: a retrospective multicenter analysis // *J Neurooncol*, 2017, Vol. 135, P. 183–192.
2. Chen W., Wang Y., Zhao B., et al. Optimal Therapies for Recurrent Glioblastoma: A Bayesian Network Meta-Analysis // *Frontiers in oncology*, 2021, 11, 641878.
3. Tirosh I., Suvà M. L. Tackling the Many Facets of Glioblastoma Heterogeneity // *Cell stem cell*, 2020, Vol. 26, no. 3, P. 303–304.
4. Becker A. P., Sells B. E., Haque S. J., Chakravarti A. Tumor Heterogeneity in Glioblastomas: From Light Microscopy to Molecular Pathology // *Cancers*, 2021, Vol. 13, no. 4, P. 761.
5. Parker, N., Hudson, A., Khong, P. et al. Intratumoral heterogeneity identified at the epigenetic, genetic and transcriptional level in glioblastoma // *Sci Rep*, 2016, Vol. 6, P. 22477.
6. Yanovich-Arad G., Ofek P., Yeini E., et al. Proteogenomics of glioblastoma associates molecular patterns with survival // *Cell Rep*, 2021, Vol. 34, no. 9, P. 108787.
7. Heiland D.H., Wörner J., Gerrit Haaker J., et al. The integrative metabolomic-transcriptomic landscape of glioblastoma multiforme // *Oncotarget*, 2017, Vol. 8, no. 30, P. 49178-49190.
8. Bradshaw A., Wickremsekera A., Tan S. T. et al. Cancer Stem Cell Hierarchy in Glioblastoma Multiforme // *Frontiers in surgery*, 2016, Vol. 3, P. 21.
9. Birzu C., French P., Caccese M., Cerretti G., Idbaih A., Zagonel V., Lombardi G. Recurrent Glioblastoma: From Molecular Landscape to New Treatment Perspectives // *Cancers*, 2020, Vol. 13, no. 1, P. 47.
10. Phillips H. S., Kharbanda S., Chen R. et al. Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis // *Cancer cell*, 2006, Vol. 9, no. 3, P. 157–173.
11. Verhaak R. G., Hoadley K. A., Purdom E. et al. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1 // *Cancer cell*, 2010, Vol. 17, no. 1, P. 98–110.
12. Lemée J.M., Clavreul A., Aubry M. et al. Integration of transcriptome and proteome profiles in glioblastoma: looking for the missing link // *BMC Molecular Biol*, 2018, Vol. 19, P. 13.
13. Zhang B., Wang J., Wang X. et al. Proteogenomic characterization of human colon and rectal cancer // *Nature*, 2014, Vol. 513, no. 7518, P. 382-387.
14. Shi Z., Fujii K., Kovary K. M. et al. Heterogeneous Ribosomes Preferentially Translate Distinct Subpools of mRNAs Genome-wide // *Molecular cell*, 2017, Vol. 67, no. 1, P. 71–83.e7.

15. Genuth N. R., Barna M. Heterogeneity and specialized functions of translation machinery: from genes to organisms // *Nature reviews. Genetics*, 2018, Vol. 19, no. 7, P. 431–452.
16. El Khoury W., Nasr Z. Deregulation of ribosomal proteins in human cancers // *Bioscience reports*, 2021, Vol. 41, no. 12, BSR20211577.
17. Brumwell A., Fell L., Obress L., Uniacke J. Hypoxia influences polysome distribution of human ribosomal protein S12 and alternative splicing of ribosomal protein mRNAs // *RNA (New York, N.Y.)*, 2020, Vol. 26, no. 3, P. 361–371.
18. Rong L., Li N., Zhang Z. Emerging therapies for glioblastoma: current state and future directions // *J Exp Clin Cancer Res*, 2022, Vol. 41, P. 142.
19. Stupp R., Mason W.P., van den Bent M.J., et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma // *N Engl J Med*, 2005, Vol. 352, P. 987-996.
20. Mao P., Joshi K., Li J., et al. Mesenchymal glioma stem cells are maintained by activated glycolytic metabolism involving aldehyde dehydrogenase 1A3 // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, Vol. 110, no. 21, P. 8644–8649.
21. Noushmehr H., Weisenberger D. J., Diefes K., et al. Identification of a CpG island methylator phenotype that defines a distinct subgroup of glioma // *Cancer cell*, 2010, Vol. 17, no. 5, P. 510–522.
22. Brennan C.W., Verhaak R.G., McKenna A., et al. The somatic genomic landscape of glioblastoma // *Cell*, 2013, Vol. 155, no. 2, P. 462-477.
23. Zhang P, Xia Q, Liu L, et al. Current Opinion on Molecular Characterization for GBM Classification in Guiding Clinical Diagnosis, Prognosis, and Therapy // *Front Mol Biosci*, 2020, Vol. 7, P. 562798.
24. Louis D. N., Perry A., Reifenberger G., et al. The 2016 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system: a summary // *Acta Neuropathol*, 2016, Vol. 131, P. 803–820.
25. Kayabolen A., Yilmaz E., Bagci-Onder T. IDH Mutations in Glioma: Double-Edged Sword in Clinical Applications? // *Biomedicines*, 2021, Vol. 9, no. 7, P. 799.
26. Ohgaki H., Kleihues P. The definition of primary and secondary glioblastoma // *Clin Cancer Res*, 2013, Vol. 19, no. 4, P. 764-772.
27. Patel A.P., Tirosh I., Trombetta J.J., et al. Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma // *Science*, 2014, Vol. 344, no. 6190, P. 1396-1401.
28. Jin X., Kim L.J.Y., Wu Q., et al. Targeting glioma stem cells through combined BMI1 and EZH2 inhibition // *Nat Med*, 2017, Vol. 23, no. 11, P. 1352-1361.

29. Bastola S., Pavlyukov M.S., Yamashita D., et al. Glioma-initiating cells at tumor edge gain signals from tumor core cells to promote their malignancy // *Nat Commun.* 2020, Vol. 11, no. 1, P. 4660.
30. Rich J.N. Cancer stem cells: understanding tumor hierarchy and heterogeneity // *Medicine (Baltimore)*, 2016, Vol. 95(1 Suppl 1), P. S2-S7.
31. Lee J., Kotliarova S., Kotliarov Y., et al. Tumor stem cells derived from glioblastomas cultured in bFGF and EGF more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumors than do serum-cultured cell lines // *Cancer Cell*, 2006, Vol. 9, no. 5, P. 391-403.
32. Brescia P., Richichi C., Pelicci G. Current strategies for identification of glioma stem cells: adequate or unsatisfactory? // *J Oncol*, 2012, Vol. 2012, P. 376894.
33. Tang X., Zuo C., Fang P., et al. Targeting Glioblastoma Stem Cells: A Review on Biomarkers, Signal Pathways and Targeted Therapy // *Frontiers in oncology*, 2021, Vol. 11, P. 701291.
34. Lathia J.D., Mack S.C., Mulkearns-Hubert E.E., et al. Cancer stem cells in glioblastoma // *Genes Dev*, 2015, Vol. 29, no. 12, P. 1203-1217.
35. Kang H., Lee H., Kim D., et al. Targeting Glioblastoma Stem Cells to Overcome Chemoresistance: An Overview of Current Therapeutic Strategies // *Biomedicines*, 2022, Vol. 10, no. 6, P. 1308.
36. Wang Z., Zhang H., Xu S. et al. The adaptive transition of glioblastoma stem cells and its implications on treatments // *Sig Transduct Target Ther*, 2021, Vol. 6, P. 124.
37. Behnan J., Finocchiaro G., Hanna G. The landscape of the mesenchymal signature in brain tumours // *Brain*, 2019, Vol. 142, P. 847–866.
38. Mukherjee S. Quiescent stem cell marker genes in glioma gene networks are sufficient to distinguish between normal and glioblastoma (GBM) samples // *Sci Rep*, 2020, Vol. 10, no. 1, P. 10937.
39. Chen J., Li Y., Yu T.S., et al. A restricted cell population propagates glioblastoma growth after chemotherapy // *Nature*, 2012, Vol. 488, no. 7412, P. 522-526.
40. Prager B. C., Bhargava S., Mahadev V., et al. Glioblastoma Stem Cells: Driving Resilience through Chaos // *Trends in cancer*, 2020, Vol. 6, no. 3, P. 223–235.
41. Wang P., Lan C., Xiong S., et al. HIF1 α regulates single differentiated glioma cell dedifferentiation to stem-like cell phenotypes with high tumorigenic potential under hypoxia // *Oncotarget*, 2017, Vol. 8, no. 17, P. 28074–28092.
42. Dirkse A., Golebiewska A., Buder T., et al. Stem cell-associated heterogeneity in Glioblastoma results from intrinsic tumor plasticity shaped by the microenvironment // *Nat Commun*, 2019, Vol. 10, P. 1787.

43. Yabo Y.A., Niclou S.P., Golebiewska A. Cancer cell heterogeneity and plasticity: A paradigm shift in glioblastoma // *Neuro Oncol*, 2022, Vol. 24, no. 5, P. 669-682.
44. Urbańska K., Sokołowska J., Szmidt M., Sysa P. Glioblastoma multiforme - an overview // *Contemporary oncology (Poznan, Poland)*, 2014, Vol. 18, no. 5, P. 307–312.
45. Brat D. J., Castellano-Sanchez A. A., Hunter S. B., et al. Pseudopalisades in glioblastoma are hypoxic, express extracellular matrix proteases, and are formed by an actively migrating cell population // *Cancer research*, 2004, Vol. 64, no. 3, P. 920–927.
46. Ahir B. K., Engelhard H. H., Lakka S. S. Tumor Development and Angiogenesis in Adult Brain Tumor: Glioblastoma // *Molecular neurobiology*, 2020, Vol. 57, no. 5, P. 2461–2478.
47. Rosińska S., Gavard J. Tumor Vessels Fuel the Fire in Glioblastoma // *Int J Mol Sci*, 2021, Vol. 22, no. 12, P. 6514.
48. Hambarzumyan D., Bergers, G. Glioblastoma: Defining Tumor Niches // *Trends in cancer*, 2015, Vol. 1, no. 4, P. 252–265.
49. Cuddapah V.A., Robel S., Watkins S., Sontheimer H. A neurocentric perspective on glioma invasion // *Nat Rev Neurosci*, 2014, Vol. 15, no. 7, P. 455-465.
50. Wang Y., Zhang F., Xiong N., et al. Remodelling and Treatment of the Blood-Brain Barrier in Glioma // *Cancer management and research*, 2021, Vol. 13, P. 4217–4232.
51. Wolf K.J., Chen J., Coombes J., et al. Dissecting and rebuilding the glioblastoma microenvironment with engineered materials // *Nat Rev Mater*, 2019, Vol. 4, no. 10, P. 651-668.
52. Hjelmeland A. B., Wu Q., Heddleston J. M., et al. Acidic stress promotes a glioma stem cell phenotype // *Cell death and differentiation*, 2011, Vol. 18, no. 5, P. 829–840.
53. Wang Y.L., Yao J., Chakhoyan A., et al. Association between Tumor Acidity and Hypervascularity in Human Gliomas Using pH-Weighted Amine Chemical Exchange Saturation Transfer Echo-Planar Imaging and Dynamic Susceptibility Contrast Perfusion MRI at 3T // *AJNR Am J Neuroradiol*, 2019, Vol. 40, no. 6, P. 979-986.
54. Swietach P., Vaughan-Jones R. D., Harris A. L., Hulikova, A. The chemistry, physiology and pathology of pH in cancer // *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 2014, Vol. 369, no. 1638, P. 20130099.
55. Pérez-Herrero E., Fernández-Medarde A. The reversed intra- and extracellular pH in tumors as a unified strategy to chemotherapeutic delivery using targeted nanocarriers // *Acta pharmaceutica Sinica. B*, 2021, Vol. 11, no. 8, P. 2243–2264.
56. Seo B. R., Delnero P., Fischbach C. In vitro models of tumor vessels and matrix: engineering approaches to investigate transport limitations and drug delivery in cancer // *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2014, Vol. 69, P. 205–216.

57. Paredes F., Williams H. C., San Martin A. Metabolic adaptation in hypoxia and cancer // *Cancer letters*, 2021, Vol. 502, P. 133–142.
58. Muz B., de la Puente P., Azab F., Azab, A. K. The role of hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy // *Hypoxia (Auckland, N.Z.)*, 2015, Vol. 3, P. 83–92.
59. Kato Y., Ozawa S., Miyamoto C. et al. Acidic extracellular microenvironment and cancer // *Cancer Cell Int*, 2013, Vol. 13, P. 89.
60. Webb B., Chimenti M., Jacobson M. et al. Dysregulated pH: a perfect storm for cancer progression // *Nat Rev Cancer*, 2011, Vol. 11, P. 671–677.
61. Corbet C., Feron, O. Tumour acidosis: from the passenger to the driver's seat. *Nature reviews // Cancer*, 2017, Vol. 17, no. 10, 577–593.
62. Vander Heiden M. G., Cantley L. C., Thompson C. B. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation // *Science (New York, N.Y.)*, 2009, Vol. 324, no. 5930, P. 1029–1033.
63. Duraj T., García-Romero N., Carrión-Navarro J., et al. Beyond the Warburg Effect: Oxidative and Glycolytic Phenotypes Coexist within the Metabolic Heterogeneity of Glioblastoma // *Cells*, 2021, Vol. 10, no. 2, P. 202.
64. Lunt S. Y., Vander Heiden M. G. Aerobic glycolysis: meeting the metabolic requirements of cell proliferation // *Annual review of cell and developmental biology*, 2011, Vol. 27, P. 441–464.
65. Zhang X., Ding K., Wang J., Li X., Zhao P. Chemoresistance caused by the microenvironment of glioblastoma and the corresponding solutions // *Biomed Pharmacother*, 2019, Vol. 109, P. 39–46.
66. Xu L., Fukumura D., Jain R. K. Acidic extracellular pH induces vascular endothelial growth factor (VEGF) in human glioblastoma cells via ERK1/2 MAPK signaling pathway: mechanism of low pH-induced VEGF // *The Journal of biological chemistry*, 2002, Vol. 277, no. 13, P. 11368–11374.
67. Kondo A., Yamamoto S., Nakaki R., et al. Extracellular Acidic pH Activates the Sterol Regulatory Element-Binding Protein 2 to Promote Tumor Progression // *Cell reports*, 2017, Vol. 18, no. 9, P. 2228–2242.
68. Rohani N., Hao L., Alexis M. S., et al. Acidification of Tumor at Stromal Boundaries Drives Transcriptome Alterations Associated with Aggressive Phenotypes // *Cancer research*, 2019, Vol. 79, no. 8, P. 1952–1966.
69. Elias A.P., Dias S. Microenvironment Changes (in pH) Affect VEGF Alternative Splicing. *Cancer Microenvironment*, 2008, Vol. 1, P. 131–139.

70. Zhang H.T., Scott P.A., Morbidelli L., et al. The 121 amino acid isoform of vascular endothelial growth factor is more strongly tumorigenic than other splice variants in vivo // *Br J Cancer*, 2000, Vol. 83, P. 63–68.
71. Rahman M. A., Krainer A. R., Abdel-Wahab O. SnapShot: Splicing Alterations in Cancer // *Cell*, 2020, Vol. 180, no. 1, P. 208–208.e1.
72. Bonnal S.C., López-Oreja I., Valcárcel J. Roles and mechanisms of alternative splicing in cancer - implications for care // *Nat Rev Clin Oncol*, 2020, Vol, 17, no. 8, P. 457-474.
73. Zhang X., Yan C., Zhan X., et al. Structure of the human activated spliceosome in three conformational states // *Cell Res*, 2018, Vol. 28, no. 3, P. 307-322.
74. Gehring N. H., Roignant J. Y. Anything but Ordinary - Emerging Splicing Mechanisms in Eukaryotic Gene Regulation // *Trends in genetics : TIG*, 2021, Vol. 37, no. 4, P. 355–372.
75. Ribeiro M., Furtado M., Martins S., et al. RNA Splicing Defects in Hypertrophic Cardiomyopathy: Implications for Diagnosis and Therapy // *Int J Mol Sci*, 2020, Vol. 21, no. 4, P. 1329.
76. Tang Z., Zhao J., Pearson Z. J., et al. RNA-Targeting Splicing Modifiers: Drug Development and Screening Assays // *Molecules (Basel, Switzerland)*, 2021, Vol. 26, no. 8, P. 2263.
77. Di C., Syafrizayanti, Zhang Q., et al. Function, clinical application, and strategies of Pre-mRNA splicing in cancer // *Cell Death Differ*, 2019, Vol. 26, P. 1181–1194.
78. Keren H., Lev-Maor G., Ast G. Alternative splicing and evolution: diversification, exon definition and function // *Nat Rev Genet*, 2010, Vol. 11, P. 345–355.
79. Jin Y., Dong H., Shi Y., Bian L. Mutually exclusive alternative splicing of pre-mRNAs // *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 2018, Vol. 9, P. e1468.
80. Wang E., Aifantis I. RNA Splicing and Cancer // *Trends Cancer*, 2020 Vol. 6, no. 8, P. 631-644.
81. Obeng E. A., Chappell R. J., Seiler M., et al. Physiologic Expression of Sf3b1(K700E) Causes Impaired Erythropoiesis, Aberrant Splicing, and Sensitivity to Therapeutic Spliceosome Modulation // *Cancer cell*, 2016, Vol. 30, no. 3, P. 404–417.
82. Zhang J., Ali A. M., Lieu Y. K., et al. Disease-Causing Mutations in SF3B1 Alter Splicing by Disrupting Interaction with SUGP1 // *Molecular cell*, 2019, Vol. 76, no. 1, P. 82–95.e7.
83. Niño C.A., Scotto di Perrotolo R., Polo S. Recurrent Spliceosome Mutations in Cancer: Mechanisms and Consequences of Aberrant Splice Site Selection // *Cancers (Basel)*, 2022, Vol/ 14, no. 2, P. 281.
84. Shuai S., Suzuki H., Diaz-Navarro A., et al. The U1 spliceosomal RNA is recurrently mutated in multiple cancers // *Nature*, 2019, Vol. 574, no. 7780, P. 712–716.

85. Cerasuolo A., Buonaguro L., Buonaguro F. M., Tornesello M. L. The Role of RNA Splicing Factors in Cancer: Regulation of Viral and Human Gene Expression in Human Papillomavirus-Related Cervical Cancer // *Frontiers in cell and developmental biology*, 2020, Vol. 8, P. 474.
86. Jeong S. SR Proteins: Binders, Regulators, and Connectors of RNA // *Mol Cells*, 2017, Vol. 40, no. 1, P. 1-9.
87. Cho S., Hoang A., Sinha R., et al. Interaction between the RNA binding domains of Ser-Arg splicing factor 1 and U1-70K snRNP protein determines early spliceosome assembly // *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, Vol. 108, no. 20, P. 8233-8238.
- ~~88. [10.1073/pnas.1017700108](https://doi.org/10.1073/pnas.1017700108)~~
89. Kataoka N., Matsumoto E., Masaki S. Mechanistic Insights of Aberrant Splicing with Splicing Factor Mutations Found in Myelodysplastic Syndromes // *Int J Mol Sci*, 2021, Vol. 22, no. 15, P. 7789.
90. Shen H., Kan J.L., Green M.R. Arginine-serine-rich domains bound at splicing enhancers contact the branchpoint to promote prespliceosome assembly // *Mol Cell*, 2004, Vol. 13, no. 3, P. 367-376.
91. Kataoka N., Matsumoto E., Masaki S. Mechanistic Insights of Aberrant Splicing with Splicing Factor Mutations Found in Myelodysplastic Syndromes // *International journal of molecular sciences*, 2021, Vol. 22, no. 15, P. 7789.
92. Graham S.V., Faizo A.A.A. Control of human papillomavirus gene expression by alternative splicing // *Virus Res*, 2017, Vol. 231, P. 83-95.
93. Shepard P.J., Hertel K.J. The SR protein family // *Genome Biol*, 2009, Vol. 10, no. 10, P. 242.
94. Jeong S. SR Proteins: Binders, Regulators, and Connectors of RNA // *Molecules and cells*, 2017, Vol. 40, no 1, P. 1–9.
95. Pastor F., Shkreta L., Chabot B., Durantel D., Salvetti A. Interplay Between CMGC Kinases Targeting SR Proteins and Viral Replication: Splicing and Beyond // *Front Microbiol*, Vol. 2021, no 12, P. 658721.
96. Cho S., Hoang A., Sinha R., et al. Interaction between the RNA binding domains of Ser-Arg splicing factor 1 and U1-70K snRNP protein determines early spliceosome assembly // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, Vol. 108, no. 20, P. 8233–8238.
97. Twyffels L., Gueydan C., Kruys V. Shuttling SR proteins: more than splicing factors // *The FEBS journal*, 2011, Vol. 278, no. 18, P. 3246–3255.
98. Shepard P. J., Hertel K. J. The SR protein family // *Genome biology*, 2009, Vol. 10, no. 10, P. 242.

99. Yang X., Zhan P., Feng S., et al. SRSF6 regulates alternative splicing of genes involved in DNA damage response and DNA repair in HeLa cells // *Oncology reports*, 2020, Vol. 44, no. 5, P. 1851–1862.
100. Park W.C., Kim H.R., Kang D.B., et al. Comparative expression patterns and diagnostic efficacies of SR splicing factors and HNRNPA1 in gastric and colorectal cancer // *BMC Cancer*, 2016, Vol. 16, P. 358.
101. Wan, L., Deng M., Zhang H. SR Splicing Factors Promote Cancer via Multiple Regulatory Mechanisms // *Genes*, 2022, Vol. 13, no. 9, P. 1659.
102. Karni R., de Stanchina E., Lowe S.W., et al. The gene encoding the splicing factor SF2/ASF is a proto-oncogene // *Nat Struct Mol Biol*, 2007, Vol. 14, no. 3, P. 185-193.
103. Feng J., Xu X., Fan X., Yi Q., Tang L. BAF57/SMARCE1 Interacting with Splicing Factor SRSF1 Regulates Mechanical Stress-Induced Alternative Splicing of Cyclin D1 // *Genes*, 2021, Vol. 12, no. 2, P. 306.
104. Zhou X., Li X., Cheng Y., et al. BCLAF1 and its splicing regulator SRSF10 regulate the tumorigenic potential of colon cancer cells // *Nat Commun*, 2014, Vol. 5, P. 4581.
105. Masaki S., Kabuto T., Suzuki K., Kataoka N. Multiple nuclear localization sequences in SRSF4 protein // *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms*, 2020, Vol. 25, no. 5, P. 327–333.
106. Ninomiya K., Kataoka N., Hagiwara M. Stress-responsive maturation of Clk1/4 pre-mRNAs promotes phosphorylation of SR splicing factor // *J Cell Biol*, 2011, Vol. 195, no 1, P. 27-40.
107. Jang H. N., Liu Y., Choi N., et al. Binding of SRSF4 to a novel enhancer modulates splicing of exon 6 of Fas pre-mRNA // *Biochemical and biophysical research communications*, 2018, Vol. 506, no. 3, P. 703–708.
108. Boutz P. L., Bhutkar A., Sharp P. A. Detained introns are a novel, widespread class of post-transcriptionally spliced introns // *Genes & development*, 2015, Vol. 29, no. 1, P. 63–80.
109. Gabriel M., Delforge Y., Deward A., et al. Role of the splicing factor SRSF4 in cisplatin-induced modifications of pre-mRNA splicing and apoptosis // *BMC Cancer*, 2015, Vol. 15, P. 227.
110. Änkö M.L., Müller-McNicoll M., Brandl H., et al. The RNA-binding landscapes of two SR proteins reveal unique functions and binding to diverse RNA classes // *Genome Biol*, 2012, Vol. 13, no. 3, P. R17.
111. Zheng X., Peng Q., Wang L., et al. Serine/arginine-rich splicing factors: the bridge linking alternative splicing and cancer // *Int J Biol Sci*, 2020, Vol. 16, no. 13, P. 2442-2453.

112. Larrasa-Alonso J., Villalba M., Sanchez-Cabo F., et al. Loss of SRSF4 in cardiomyocytes induces hypertrophy, diastolic dysfunction and risk of sudden death // *European Heart Journal*, 1981, Vol. 38, no. 1, P. ehx502.1981,
113. Tan W., Wang W., Ma Q. Physiological and Pathological Function of Serine/Arginine-Rich Splicing Factor 4 and Related Diseases // *BioMed research international*, 2018, P. 3819719.
114. Park S., Brugiolo M., Akerman M., et al. Differential Functions of Splicing Factors in Mammary Transformation and Breast Cancer Metastasis // *Cell Rep*, 2019, Vol. 29, no. 9, P. 2672-2688.e7.
115. Khatter H., Myasnikov A.G., Natchiar S.K., Klaholz B.P. Structure of the human 80S ribosome // *Nature*, 2015, Vol. 520, no. 7549, P. 640-645.
116. Genuth N. R., Barna M. Discovery of Ribosome Heterogeneity and Its Implications for Gene Regulation and Organismal Life // *Molecular cell*, 2018, Vol. 71, no. 3, P. 364–374.
117. Gay D.M., Lund A.H., Jansson M.D. Translational control through ribosome heterogeneity and functional specialization // *Trends Biochem Sci*, 2022, Vol. 47, no. 1, P. 66-81.
118. Parks M.M., Kurylo C.M., Dass RA, et al. Variant ribosomal RNA alleles are conserved and exhibit tissue-specific expression // *Sci. Adv*, 2018, Vol. 4, P. pp.eaao0665.
119. Genuth N.R., Barna M. The Discovery of Ribosome Heterogeneity and Its Implications for Gene Regulation and Organismal Life // *Mol Cell*, 2018, Vol. 71, no. 3, P. 364-374.
120. Taoka, M., Nobe, Y., Yamaki, Y., et al. Landscape of the complete RNA chemical modifications in the human 80S ribosome // *Nucleic acids research*, 2018, Vol. 46, no. 18, P. 9289–9298.
121. Krogh N., Jansson M.D., Häfner S.J., et al. Profiling of 2'-O-Me in human rRNA reveals a subset of fractionally modified positions and provides evidence for ribosome heterogeneity // *Nucleic Acids Res*, 2016, Vol. 44, no. 16, P. 7884-7895.
122. Esguerra J., Warringer J., Blomberg, A. Functional importance of individual rRNA 2'-O-ribose methylations revealed by high-resolution phenotyping // *RNA (New York, N.Y.)*, 2008, Vol. 14, no. 4, P. 649–656.
123. Jansson M. D., Häfner S. J., Altinel K., et al. Regulation of translation by site-specific ribosomal RNA methylation // *Nature structural & molecular biology*, 2021, Vol. 28, no. 11, P. 889–899.
124. Shi Z., Fujii K., Kovary K. M., et al. Heterogeneous Ribosomes Preferentially Translate Distinct Subpools of mRNAs Genome-wide // *Molecular cell*, 2017, Vol. 67, no. 1, P. 71–83.e7.

125. Ghulam M. M., Catala M., Abou Elela S. Differential expression of duplicated ribosomal protein genes modifies ribosome composition in response to stress // *Nucleic acids research*, 2020, Vol. 48, no. 4, P. 1954–1968.
126. Lilleorg S., Reier K., Volõnkin P. et al. Phenotypic effects of paralogous ribosomal proteins bL31A and bL31B in *E. coli* // *Sci Rep*, 2020, Vol. 10, P. 11682.
127. Lopes A.M., Miguel R.N., Sargent C.A., et al. The human RPS4 paralogue on Yq11.223 encodes a structurally conserved ribosomal protein and is preferentially expressed during spermatogenesis // *BMC Mol Biol*, 2010, Vol. 11, P. 33.
128. Xue S., Barna M. Specialized ribosomes: a new frontier in gene regulation and organismal biology // *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2012, Vol. 13, no. 6, P. 355-369.
129. Naora H., Takai I., Adachi M., Naora H. Altered cellular responses by varying expression of a ribosomal protein gene: sequential coordination of enhancement and suppression of ribosomal protein S3a gene expression induces apoptosis // *The Journal of cell biology*, 1998, Vol. 141, no. 3, P. 741–753.
130. Guo X., Shi Y., Gou Y., et al. Human ribosomal protein S13 promotes gastric cancer growth through down-regulating p27(Kip1) // *Journal of cellular and molecular medicine*, 2011, Vol. 15, no. 2, P. 296–306.
131. Shi Y., Zhai H., Wang X., et al. Ribosomal proteins S13 and L23 promote multidrug resistance in gastric cancer cells by suppressing drug-induced apoptosis // *Experimental cell research*, 2004, Vol. 296, no. 2, P. 337–346.
132. Kobayashi T., Sasaki Y., Oshima Y., et al. Activation of the ribosomal protein L13 gene in human gastrointestinal cancer // *International journal of molecular medicine*, 2006, Vol. 18, no. 1, P. 161–170.
133. Shi J., Zhang L., Zhou D., et al. Biological Function of Ribosomal Protein L10 on Cell Behavior in Human Epithelial Ovarian Cancer // *Journal of Cancer*, 2018, Vol. 9, no. 4, P. 745–756.
134. Pollutri D., Penzo M. Ribosomal Protein L10: From Function to Dysfunction // *Cells*, 2020, Vol. 9, no. 11, P. 2503.
135. Yang M., Sun H., Wang H., et al. Down-regulation of ribosomal protein L22 in non-small cell lung cancer // *Medical oncology (Northwood, London, England)*, 2013, Vol. 30, no. 3, P. 646.
136. Rao S., Stadanlick J.E., Cai K.Q., et al. Abstract 5215: Loss of Rpl22 promotes tumor progression through regulation of angiogenesis // *Cancer Res*, 2015, Vol. 75(15 Suppl), P. 5215.
137. Warner J. R., McIntosh K. B. How common are extraribosomal functions of ribosomal proteins? // *Molecular cell*, 2009, Vol. 34, no. 1, P. 3–11.

138. Wan F., Anderson D. E., Barnitz R. A., et al. Ribosomal protein S3: a KH domain subunit in NF-kappaB complexes that mediates selective gene regulation // *Cell*, 2007, Vol. 131. No. 5, P. 927–939.
139. Wang R., Peng C., Song J., et al. Downregulated RRS1 inhibits invasion and metastasis of BT549 through RPL11-c-Myc-SNAIL axis // *International journal of oncology*, 2022, Vol. 60, no. 3, P. 33.
140. Liao J. M., Zhou X., Gatignol A., Lu H. Ribosomal proteins L5 and L11 co-operatively inactivate c-Myc via RNA-induced silencing complex // *Oncogene*, 2014, Vol. 33, no. 41, P. 4916–4923.
141. Zhou X., Hao Q., Liao J. M., et al. Ribosomal protein S14 negatively regulates c-Myc activity // *The Journal of biological chemistry*, 2013, Vol. 288, no. 30, P. 21793–21801.
142. Jang C. Y., Lee J. Y., Kim J. RpS3, a DNA repair endonuclease and ribosomal protein, is involved in apoptosis // *FEBS letters*, 2004, Vol. 560, no. 1-3, P. 81–85.
143. Jang C. Y., Kim H. D., Kim J. Ribosomal protein S3 interacts with TRADD to induce apoptosis through caspase dependent JNK activation // *Biochemical and biophysical research communications*, 2012, Vol. 421, no. 3, P. 474–478.
144. Wu F., Sun D., Liao Y. et al. RPL35A is a key promotor involved in the development and progression of gastric cancer // *Cancer Cell Int*, 2021, Vol. 21, P. 497.
145. Lopez C. D., Martinovsky G., Naumovski L. Inhibition of cell death by ribosomal protein L35a // *Cancer letters*, 2002, Vol. 180, no. 2, P. 195–202.
146. Stadanlick J. E., Zhang Z., Lee S. Y., et al. Developmental arrest of T cells in Rpl22-deficient mice is dependent upon multiple p53 effectors // *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 2011, Vol. 187, no. 2, P. 664–675.
147. Rao S., Cai K. Q., Stadanlick J. E., et al. Ribosomal Protein Rpl22 Controls the Dissemination of T-cell Lymphoma // *Cancer research*, 2016, Vol. 76, no. 11, P. 3387–3396.
148. Vlachos A. Acquired ribosomopathies in leukemia and solid tumors. *Hematology // American Society of Hematology. Education Program*, 2017, Vol. 2017, no. 1, P. 716–719.
149. Zhou C., Weng J., Liu C., et al. High RPS3A expression correlates with low tumor immune cell infiltration and unfavorable prognosis in hepatocellular carcinoma patients // *American journal of cancer research*, 2020, Vol. 10, no. 9, P. 2768–2784.
150. O'Leary M. N., Schreiber K. H., Zhang Y., et al. The ribosomal protein Rpl22 controls ribosome composition by directly repressing expression of its own paralog, Rpl2211 // *PLoS genetics*, 2013, Vol. 9, no. 8, P. e1003708.

151. Zhang Y., Duc A. C., Rao S., et al. Control of hematopoietic stem cell emergence by antagonistic functions of ribosomal protein paralogs // *Developmental cell*, 2013, Vol. 24, no. 4, P. 411–425.
152. Wu N., Wei J., Wang Y., et al. Ribosomal L22-like1 (RPL22L1) Promotes Ovarian Cancer Metastasis by Inducing Epithelial-to-Mesenchymal Transition // *PloS one*, 2015, Vol. 10, no. 11, P. e0143659.
153. Rao S., Peri S., Hoffmann J., et al. RPL22L1 induction in colorectal cancer is associated with poor prognosis and 5-FU resistance // *PloS one*, 2019, Vol. 14, no. 10, P. e0222392.
154. Zhang Y., O'Leary M. N., Peri S., et al. Ribosomal Proteins Rpl22 and Rpl22l1 Control Morphogenesis by Regulating Pre-mRNA Splicing // *Cell reports*, 2017, Vol. 18, no. 2, P. 545–556.
155. Павлюков М. С. Роль апоптоза в трансформации опухолей: новые подходы к терапии глиом: дис. ... док. биол. наук.: 03.01.03. – ИБХ РАН, Москва, 2019, 219 с.
156. Smith P.K., Krohn R.I., Hermanson G.T., et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid // *Anal. Biochem*, 1985, V. 150, no. 1, P. 76–85.
157. Wessel D., Flügge U.I. A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids // *Anal. Biochem*, 1984, V. 138, no. 1, P. 141–143.
158. Belin S., Hacot S., Daudignon L., et al. Purification of ribosomes from human cell lines // *Curr Protoc Cell Biol*, 2010, Chapter 3.
159. Kent W.J., Sugnet C.W., Furey T.S., et al. The human genome browser at UCSC // *Genome Res*, 2002, Vol. 12, no. 6, P. 996-1006.
160. Pollard K.S., Hubisz M.J., Rosenbloom K.R., Siepel A. Detection of nonneutral substitution rates on mammalian phylogenies // *Genome Res*, 2010, Vol. 20, no. 1, P. 110-121.
161. Blanchette M., Kent W.J., Riemer C., et al. Aligning multiple genomic sequences with the threaded blockset aligner // *Genome Res*, 2004, Vol. 14, no. 4, P. 708-715.
162. Gularyan S.K., Gulin A.A., Anufrieva K.S., et al. Investigation of Inter- and Intratumoral Heterogeneity of Glioblastoma Using TOF-SIMS // *Mol Cell Proteomics*, 2020, Vol. 19, no. 6, P. 960-970.
163. Minata M., Audia A., Shi J., et al. Phenotypic Plasticity of Invasive Edge Glioma Stem-like Cells in Response to Ionizing Radiation // *Cell Rep*, 2019, Vol. 26, no. 7, P. 1893-1905.
164. Sato H., Singer R.H. Cellular variability of nonsense-mediated mRNA decay // *Nat Commun*, 2021, Vol. 12, no. 1. P. 7203.
165. Hoek T.A., Khuperkar D., Lindeboom R.G.H., et al. Single-Molecule Imaging Uncovers Rules Governing Nonsense-Mediated mRNA Decay // *Mol Cell*, 2019, Vol. 75, no. 2, P. 324-339.e11.

166. Lindeboom R.G., Supek F., Lehner B. The rules and impact of nonsense-mediated mRNA decay in human cancers // *Nat Genet*, 2016, Vol. 48, no. 10, P. 1112-1118.
167. Martin L., Grigoryan A., Wang D., et al. Identification and characterization of small molecules that inhibit nonsense-mediated RNA decay and suppress nonsense p53 mutations // *Cancer Res*, 2014, Vol. 74, no. 11, P. 3104-3113.
168. Longman D., Jackson-Jones K.A., Maslon M.M., et al. Identification of a localized nonsense-mediated decay pathway at the endoplasmic reticulum // *Genes Dev*, 2020, Vol. 34, no. 15-16, P. 1075-1088.
169. Michel A.M., Fox G., M Kiran A., et al. GWIPS-viz: development of a ribo-seq genome browser // *Nucleic Acids Res*, 2014, Vol. 42(Database issue), P. D859-D864.
170. Choudhary S., Burns S.C., Mirsafian H., et al. Genomic analyses of early responses to radiation in glioblastoma reveal new alterations at transcription, splicing, and translation levels // *Sci Rep*, 2020, Vol. 10, no. 1, P. 8979.
171. Pearson H., Daouda T., Granados D.P., et al. MHC class I-associated peptides derive from selective regions of the human genome // *J Clin Invest*, 2016, Vol. 126, no. 12, P. 4690-4701.
172. Sonabend A.M., Bansal M., Guarnieri P., et al. The transcriptional regulatory network of proneural glioma determines the genetic alterations selected during tumor progression // *Cancer Res*, 2014, Vol. 74, no. 5, P. 1440-1451.
173. Moreb J.S. Aldehyde dehydrogenase as a marker for stem cells // *Curr Stem Cell Res Ther*, 2008, Vol. 3, no. 4, P. 237-246.
174. Julian L.M., Stanford W.L. Organelle Cooperation in Stem Cell Fate: Lysosomes as Emerging Regulators of Cell Identity // *Front Cell Dev Biol*, 2020, Vol. 8, P. 591.
175. Wu G., Fan L., Edmonson M.N., et al. Inhibition of SF3B1 by molecules targeting the spliceosome results in massive aberrant exon // *RNA*, 2018, Vol. 24, no. 8, P. 1056-1066.
176. Dewaele M., Tabaglio T., Willekens K., et al. Antisense oligonucleotide-mediated MDM4 exon 6 skipping impairs tumor growth // *J Clin Invest*, 2016, Vol. 126, no. 1, P. 68-84.
177. Tripathi V., Ellis J.D., Shen Z., et al. The nuclear-retained noncoding RNA MALAT1 regulates alternative splicing by modulating SR splicing factor phosphorylation // *Mol Cell*, 2010, Vol. 39, no. 6, P. 925-938.
178. Latorre E., Carelli S., Raimondi I., et al. The Ribonucleic Complex HuR-MALAT1 Represses CD133 Expression and Suppresses Epithelial-Mesenchymal Transition in Breast Cancer // *Cancer Res*, 2016, Vol. 76, no. 9, P. 2626-2636.
179. Naro C., De Musso M., Delle Monache F., Panzeri V., de la Grange P., Sette C. The oncogenic kinase NEK2 regulates an RBFOX2-dependent pro-mesenchymal splicing program in triple-negative breast cancer cells // *J Exp Clin Cancer Res*, 2021, Vol. 40, no. 1, P. 397.

180. Naro C., Bielli P., Sette C. Oncogenic dysregulation of pre-mRNA processing by protein kinases: challenges and therapeutic opportunities // FEBS J, 2021, Vol. 288, no. 21, P. 6250-6272.
181. Etienne-Manneville S., Hall A. Rho GTPases in cell biology // Nature, 2002, Vol. 420, no. 6916, P. 629-635.
182. Anufrieva K.S., Shender V.O., Arapidi G.P., et al. Therapy-induced stress response is associated with downregulation of pre-mRNA splicing in cancer cells // Genome Med, 2018, Vol. 10, no. 1, P. 49.
183. Larionova T.D., Bastola, S., Aksinina, T.E. et al. Alternative RNA splicing modulates ribosomal composition and determines the spatial phenotype of glioblastoma cells // Nat Cell Biol, 2022, Vol. 24, P. 1541–1557.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Таблица 1. Олигонуклеотиды, использованные в работе, и их последовательности.

Ген	Олигонуклеотид	Последовательность 5'→3'
Праймеры для ПЦР в реальном времени		
<i>18S</i>	18S_for	GGC CCT GTA ATT GGA ATG AGT C
	18S_rev	CCA AGA TCC AAC TAC GAG CTT
<i>ALDH1A3</i>	ALDH1A3_for	CCA AGA TCC AAC TAC GAG CTT
	ALDH1A3_rev	CCA AGA TCC AAC TAC GAG CTT
<i>ALDH3A2</i>	ALDH3A2_for	CTC TGG GAG TGG TGC TGA TAA T
	ALDH3A2_rev	GCT GTA TTT TCA CTC AGT TCA GAA G
<i>CD133</i>	CD133_for	ACT CCC ATA AAG CTG GAC CC
	CD133_rev	TCA ATT TTG GAT TCA TAT GCC TT
<i>CDK5</i>	CDK5_for	GTC GAT GAC CAG TTG AAG AGG AT
	CDK5_rev	GTC TGG CAG CTT GGT CAT AGA G
<i>GAPDH</i>	GAPDH_for	GAA GGT GAA GGT CGG AGT CA
	GAPDH_rev	TTG AGG TCA ATG AAG GGG TC
<i>GFAP</i>	GFAP_for	ACC TGC AGA TTC GAG AAA CC
	GFAP_rev	CTC CTT AAT GAC CTC TCC ATC C
<i>Ki67</i>	Ki67_for	TGA CCC TGA TGA GAA AGC TCA A
	Ki67_rev	CCC TGA GCA ACA CTG TCT TTT
<i>MALAT</i>	MALAT_for2	AGA CTG GAG AAG ATA GGC ATT TGA G
	MALAT_rev2	GCC AAG TCT GTT ATG TTC ACC TG
<i>MDM4-L</i>	MDM4-L_for	ACT GCT ACT ACA GAT GCT GCT CA
	MDM4-L_rev	TTT CCT CTG CAC TTT GCT TCA GTT
<i>MDM4-S</i>	MDM4-S_for	GGT CAG TAC ATA ATG GTG AAG CAA CT
	MDM4-S_rev	ACT TTC CTC TGC ACT TTG CTG TAG
<i>NANOG</i>	NANOG_for	CCT GAA GAA AAC TAT CCA TCC TTG C
	NANOG_rev	ACA GTT CTG GTC TTC TGT TTC TTG A
<i>Oct4</i>	Oct4_for	TGC AAA GCA GAA ACC CTC GT
	Oct4_rev	TGT GCA TAG TCG CTG CTT GAT
<i>TP53</i>	P53_for	ACC TAT GGA AAC TAC TTC CTG AAA A
	P53_rev	CCG GGG ACA GCA TCA AAT CA
<i>RPL22</i>	RPL22_for	TCT TGA TTG CAC CCA CCC TGT

	RPL22_rev	ATG TCA CGG TGA TCT TGC TCT T
<i>RPL22L1</i>	qRPL22L1_for (Ex3)	CCA GTA GAA GAT GGA ATT TTT GAT T
	qRPL22L1_rev (Ex3)	CAT TGA CTT TAA CCT TCT CCC G
<i>RPL22L1</i>	qRPL22L1_for (3'UTR)	GAG ATT AGG GAG GAC AAG AAT GAT G
	qRPL22L1_rev (3'UTR)	TGC ATA GAT TAG GTT GTA ACT GTC CA
<i>RPN2</i>	RPN2_for	CCA GTG GTT ATT ATG ACT TCC TTG T
	RPN2_rev	ACA TTT GTG ATG CCA ACT TCA GT
<i>SOX2</i>	SOX2_for	GTC ATT TGC TGT GGG TGA TG
	SOX2_rev	AGA AAA ACG AGG GAA ATG GG
<i>SRSF4</i>	SRSF4_for	CGA TGT GGA GCG CTT CTT TA
	SRSF4_rev	AAG GTC TTT GCC ATT CAG TTC ATA A
<i>VEGF</i>	VEGF_for	TGC AGA TTA TGC GGA TCA AAC C
	VEGF_rev	GC ATT CAC ATT TGT TGT GCT GTA G
Праймеры для нокдауна SRSF4		
<i>SRSF4</i>	48shSRSF4	CTT TGT GGT GAG CGA GTA ATT
<i>SRSF4</i>	49shSRSF4	GAC GCA GTG GAT ATG GTT ATA
Праймеры для клонирования		
<i>RPL22L1</i>	BglII-RPL22L1	AAA AAG ATC TAT GGC GCC GCA GAA AGA C
	RPL22L1-Sall	ATA AGT CGA CTG CCT AGT CCT CCG ACT CTG ATT
<i>RPL22L1</i>	EcoRI-RPL22L1	AAA AGA ATT CAT GGC GCC GCA GAA AGA C
	RPL22L1-BamHI	ATA TGG ATC CTG CCT AGT CCT CCG ACT CTG ATT
<i>Fc</i>	NheI-ATG-Fc	AAA AGC TAG CAT GGA CAA AAC TCA CAC ATG CCC A
	Fc-GS-EcoRI	AAA AGA ATT CAG ATC CTC CTC CTC CTT TAC CCG GAG ACA GGG AGA GGC T
<i>SRSF1</i>	EcoRI-SRSF1	CAA AGA ATT CGT CGG GAG GTG GTG TGA TT
	SRSF1-Sall	CCC AGT CGA CGT GTC ACC AAT CAT CTT ATG T

<i>SRSF2</i>	EcoRI-SRSF2	AAA TGA ATT CTA TGA GCT ACG GCC GCC CCC CTC C
	SRSF2-BamHI	AAA AGG ATC CAA AGA GGA CAC CGC TCC TTC
<i>SRSF3</i>	EcoRI-SRSF3	AAA AGA ATT CCC ATC GTG ATT CCT GTC CAT T
	SRSF3-SalI	ATA AGT CGA CTG GGC TAT TTC CTT TCA TTT GA
<i>SRSF4</i>	EcoRI-SRSF4	AAA AGA ATT CGC CAG CCA TCA CTG CCG TT
	SRSF4-SalI	AAA AGT CGA CCC ATA GCC AGT TAG GAC CTT GAG TG
<i>SRSF4</i>	EcoRI-SRSF4(2)	AAA AGA ATT CCC AGC CAT CAC TGC CGT T
	SRSF4-BamHI(2)	AAT TGG ATC CCC ATA GCC AGT TAG GAC CTT GAG TG

Таблица. 2. Первичные культуры GBM, использованный в данной работе.

Клеточная линия	Диагноз пациента	Статус опухоли	Фенотип (по данным РНК-секвенирования)
001	Глиобластома IV степени (ВОЗ)	Рецидивирующая	Краевой
006	Глиобластома, степень IV (ВОЗ)	Первичная	Коровый
007	Анапластическая астроцитома III степени (ВОЗ)	Первичная	NA
010	Глиобластома, степень IV (ВОЗ)	Рецидивирующая	Коровый
157	Глиобластома, степень IV (ВОЗ)	Первичная	Краевой
020	Анапластическая олигодендроглиома III степени (ВОЗ)	Первичная	NA
022	Глиобластома, степень IV (ВОЗ)	Первичная	Коровый
025	Глиобластома, степень IV (ВОЗ)	Первичная	Краевой

030	Глиобластома, степень IV (ВОЗ)	Первичная	Коровый
083	Глиобластома, степень IV (ВОЗ)	Первичная	Коровый
267	Глиобластома, степень IV (ВОЗ)	Первичная	Коровый
1051	Глиобластома, степень IV (ВОЗ)	Первичная	Краевой
1079	Глиобластома, степень IV (ВОЗ)	Первичная	Краевой
1763	Глиобластома, степень IV (ВОЗ)	Первичная	NA
U87MG	NA	NA	NA
NHA	NA	NA	NA