

Федеральное агентство научных организаций (ФАНО России)  
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт биоорганической химии  
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова  
Российской академии наук (ИБХ РАН)

На правах рукописи

Семёнова Галина Владимировна

**р21-Активируемые киназы I группы как терапевтические мишени  
злокачественных опухолей оболочек периферических нервов**

Специальность 03.01.03 – молекулярная биология

Диссертация на соискание учёной степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель –  
проф., член-корр. РАН, д.б.н.  
С.М. Деев

Москва 2017

## Оглавление

1. ВВЕДЕНИЕ.....	6
2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	11
<b>2.1. p21-Активируемые киназы: классификация, строение и механизмы активации .....</b>	<b>11</b>
<b>2.2. Роль p21-активируемых киназ в росте и распространении злокачественных опухолей .....</b>	<b>15</b>
2.2.1. Регуляция клеточной пролиферации и апоптоза.....	15
2.2.2. Регуляция клеточной миграции и инвазии.....	18
<b>2.3. Ингибиторы p21-активируемых киназ I группы (PAK1/2/3) и их использование в доклинических испытаниях.....</b>	<b>20</b>
2.3.1. АТФ-конкурентные ингибиторы p21-активируемых киназ.....	20
2.3.2. Аллостерические ингибиторы p21-активируемых киназ .....	25
<b>2.4. Этиология и молекулярные механизмы развития злокачественных опухолей оболочек периферических нервов (MPNST).....</b>	<b>28</b>
2.4.1. Опухоли оболочек периферических нервов при нейрофиброматозе I типа.....	28
2.4.2. <i>NF1</i> – классический онкосупрессорный ген .....	29
2.4.3. Нейрофибромин и его роль в Ras-опосредованной сигнальной трансдукции.....	30
2.4.4. Молекулярная генетика опухолей оболочек периферических нервов .....	32
<b>2.5. Современные подходы к терапии MPNST. Адресная терапия MPNST.....</b>	<b>37</b>

2.5.1.	Ингибиторы рецепторных тирозинкиназ .....	37
2.5.2.	Ингибиторы Ras .....	41
2.5.3.	Ингибиторы каскадов MAPK/ERK и PI3K.....	42
2.5.4.	Ингибиторы каскада Wnt> $\beta$ -катенин.....	43
2.5.5.	Нифедипин и кантаридин – потенциальные агенты для терапии MPNST .....	43
<b>2.6.</b>	<b>Роль p21-активируемых киназ в патогенезе опухолей оболочек периферических нервов.....</b>	<b>45</b>
<b>3.</b>	<b>МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ .....</b>	<b>49</b>
<b>3.1.</b>	<b>Оборудование и материалы .....</b>	<b>49</b>
<b>3.2.</b>	<b>Буферные растворы.....</b>	<b>52</b>
<b>3.3.</b>	<b>Линии эукариотических клеток.....</b>	<b>52</b>
<b>3.4.</b>	<b>Лабораторные животные.....</b>	<b>53</b>
<b>3.5.</b>	<b>Тканевые микроматрицы.....</b>	<b>53</b>
<b>3.6.</b>	<b>Методы .....</b>	<b>54</b>
3.6.1.	Культивирование клеточных линий.....	54
3.6.2.	Приготовление белковых лизатов .....	54
3.6.3.	Иммуноблоттинг .....	54
3.6.4.	Ретровирусная трансдукция.....	55
3.6.5.	Трансфекция малой интерферирующей РНК .....	56
3.6.6.	Построение кривых роста .....	56
3.6.7.	Анализ жизнеспособности клеток <i>in vitro</i> .....	57
3.6.8.	Анализ клеточной инвазии.....	57

3.6.9. Исследование противоопухолевой активности Frax1036 и PD0325901 в модели подкожных ксенографтных MPNST .....	58
3.6.10. Исследование противоопухолевой активности Frax1036 и PD0325901 в модели экспериментальных лёгочных метастазов MPNST .....	59
3.6.11. Билюминесцентная визуализация метастазов .....	59
3.6.12. Подготовка образцов тканей для гистологических исследований ... ..	60
3.6.13. Иммуногистохимическое исследование.....	60
3.6.14. Построение кривых доза/эффект, расчёт полумаксимальной эффективной концентрации (IC <sub>50</sub> ) и комбинационного индекса (CI)...	62
3.6.15. Статистическая обработка данных.....	62
<b>4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ .....</b>	<b>63</b>
<b>4.1. Оценка активности PAK1/2/3 в злокачественных опухолях оболочек периферических нервов человека .....</b>	<b>63</b>
4.1.1. Измерение уровня фосфо-PAK1/2/3 [S144/S141/S139] в биоптатах MPNST человека .....	63
4.1.2. Измерение уровней белков и фосфо-белков PAK1/2/3 в клеточных линиях MPNST .....	66
<b>4.2. Изучение роли PAK1/2/3 в регуляции пролиферативной и двигательной активности клеток MPNST.....</b>	<b>67</b>
4.2.1. Ингибирование каталитической активности PAK1/2/3 .....	67
4.2.2. Влияние выключения PAK1/2/3 на рост и выживаемость клеток MPNST .....	69

4.2.3. Влияние выключения PAK1/2/3 на клеточную инвазию MPNST .....	75
<b>4.3. Изучение роли PAK1/2/3 во внутриклеточной сигнализации MPNST.....</b>	<b>78</b>
<b>4.4. Индивидуальное и сочетанное воздействие ингибиторов PAK1/2/3 (Frax1036) и MEK1/2 (PD0325901) на рост и распространение MPNST .....</b>	<b>86</b>
4.4.1. Синергическое воздействие Frax1036 и PD0325901 на клетки MPNST <i>in vitro</i> .....	86
4.4.2. Влияние Frax1036 и PD0325901 на рост подкожных ксенографтных MPNST .....	88
4.4.3. Влияние Frax1036 и PD0325901 на формирование и рост экспериментальных лёгочных метастазов MPNST.....	94
5. ВЫВОДЫ .....	99
6. БЛАГОДАРНОСТИ.....	101
7. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ .....	102
8. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	106

## 1. Введение

### Актуальность темы исследования

Злокачественными опухолями оболочек периферических нервов (malignant peripheral nerve sheath tumors, MPNST) называют редкие саркомы мягких тканей, которые развиваются из потомков клеток нервного гребня (шванновских клеток или их предшественников). Около половины случаев MPNST обнаруживают у пациентов с нейрофиброматозом I типа (НФИ, болезнь Реклингхаузена) – врождённым заболеванием, связанным с инактивацией гена-супрессора опухолевого роста *NF1* [1]. Продукт гена *NF1*, белок нейрофибромин (neurofibromin, NF1), относится к группе белков-активаторов ГТФазы (GTPase activating protein, GAP) [2], регулирующих функцию белков Ras. Утрата нейрофибромина в клетках периферической нейроглии приводит к нарушению Ras-опосредованной сигнальной трансдукции, усилению митогенных стимулов в этих клетках и формированию доброкачественных опухолей оболочек периферических нервов (плексиформных нейрофибром, ПНФ) [2, 3]. Аккумулируя вторичные мутации, плексиформные нейрофибромы могут озлокачиваться и перерождаться в MPNST [4, 5].

MPNST свойственна высокая генетическая и фенотипическая гетерогенность, агрессивный рост и устойчивость к классическим методам противоопухолевой терапии [4]. В связи с этим в последнее десятилетие появился значительный интерес к поиску специфических маркеров MPNST, новых диагностических и прогностических критериев, а также возможностей направленной (адресной) терапии этих заболеваний [6-8]. В качестве мишеней адресной терапии MPNST были предложены компоненты важнейших Ras-зависимых сигнальных путей MAPK/ERK и PI3K, а также компоненты канонического сигнального каскада Wnt. Активация этих каскадов была обнаружена в некоторых NF1-дефицитных

клетках, клетках плексиформных нейрофибром и MPNST [9-16]. Действительно, ингибиторы узловых сигнальных молекул в составе каскадов MAPK/ERK, PI3K и Wnt демонстрируют избирательную токсичность в отношении NF1-дефицитных клеток и MPNST, а их комбинации – синергичную токсичность [15, 17-20]. Такие комбинации, однако, вызывают ряд нежелательных побочных эффектов, и поиск новых мишеней адресной терапии MPNST остаётся актуальной задачей.

Большое количество литературных данных показывает, что p21-активируемые киназы (p21-activated kinases, PAK) I группы могут выполнять ключевую роль в сигнальной трансдукции клеток опухолей оболочек периферических нервов [7, 21]. Эта группа протеинкиназ включает три члена (PAK1, PAK2 и PAK3), которые осуществляют передачу внутриклеточных стимулов от малых ГТФаз CDC42 и RAC1 к транскрипционным факторам и другим белкам, ответственным за выживание, пролиферативную активность и движение клеток [22]. Во многих типах опухолей белки PAK регулируют сигнальные каскады MAPK/ERK, PI3K и Wnt, важные для роста MPNST. Предполагают, что PAK контролируют клеточную миграцию и инвазию опухолевых клеток [23], что может иметь большое значение для метастазирующих MPNST.

Уровни генной экспрессии, уровни белков и активность PAK в MPNST на сегодняшний день не были определены, однако, было обнаружено увеличение количества копий гена и мРНК *RAC1* – важнейшего регулятора активности PAK I-ой группы (PAK1/2/3) [7]. Установлено, что интродукция доминантно-негативного PAK1 подавляет Ras-зависимую трансформацию шванновских клеток, а также замедляет рост ксенографтов MPNST [21]. Эти данные позволяют предположить, что PAK I группы представляют собой перспективные мишени адресной терапии злокачественных опухолей периферических нервов. В настоящее время получено несколько специфических низкомолекулярных

ингибиторов RAK1/2/3 [24, 25], которые могут быть использованы для индивидуальной или комбинационной терапии MPNST в доклинических испытаниях.

**Цель работы:** оценка значимости p21-активируемых киназ I группы (RAK1/2/3) в качестве потенциальных мишеней для терапии злокачественных опухолей оболочек периферических нервов (MPNST).

**Задачи:**

- 1) изучить взаимосвязь между молекулярными и клинико-морфологическими характеристиками опухолей оболочек периферических нервов и уровнем фосфорилирования p21-активируемых киназ I группы (RAK1/2/3) в опухолевых тканях;
- 2) изучить влияние ингибиторов RAK1/2/3, а также генетического нокадауна *RAK1/2/3* на пролиферативную и двигательную активность клеток злокачественных опухолей оболочек периферических нервов;
- 3) провести анализ изменения активности сигнальных каскадов MAPK/ERK, PI3K и Wnt, а также изменения уровней E- и N-кадгерина в клетках злокачественных опухолей оболочек периферических нервов в ответ на ингибирование RAK1/2/3 и выключение *RAK1/2/3*;
- 4) оценить эффект фармакологического ингибирования RAK1/2/3 на рост подкожных ксенографтных опухолей и экспериментальных лёгочных метастазов злокачественных опухолей оболочек периферических нервов *in vivo*.
- 5) провести анализ сочетанного воздействия низкомолекулярных ингибиторов RAK1/2/3 (Frax1036) и MEK1/2 (PD0325901) на рост злокачественных опухолей оболочек периферических нервов *in vitro* и *in vivo*.



## **Научная новизна**

В данной работе была впервые изучена возможность использования РАК1/2/3 в качестве терапевтических мишеней МРNST. Впервые установлена взаимосвязь между активностью РАК1/2/3 в клетках опухолей оболочек периферических нервов и степенью злокачественности этих опухолей. Впервые изучены эффекты фармакологического ингибирования РАК1/2/3 и генетического нокаута *РАК1/2/3* на рост и распространение МРNST в моделях *in vitro* и *in vivo*. Впервые проведён анализ изменения внутриклеточной сигнализации клеток МРNST в ответ на выключение РАК1/2/3. Впервые был продемонстрирован синергический эффект комбинации ингибиторов киназ MEK1/2 и РАК1/2/3 на рост и метастазирование МРNST.

## **Практическая значимость**

Данные, полученные в работе, вносят вклад в понимание молекулярных механизмов роста и метастазирования злокачественных опухолей оболочек периферических нервов. Определение положения РАК1/2/3 в цепи сигнальной трансдукции МРNST имеет фундаментальное значение для изучения роли p21-активируемых киназ в биологии опухолевых клеток.

Проведённые доклинические испытания ингибиторов РАК1/2/3 в клеточных и мышинных моделях МРNST являются важным этапом на пути к разработке новых рациональных стратегий молекулярно-прицельной терапии этого заболевания. Обнаруженная взаимосвязь между активностью РАК1/2/3 в клетках МРNST и чувствительностью этих клеток к выключению РАК1/2/3 позволяют предложить фосфо-РАК1/2/3 в качестве потенциального биомаркёра для предсказания терапевтического ответа МРNST на воздействие ингибиторов РАК1/2/3. Предложенная схема сочетанной терапии ингибитором РАК1/2/3 Frax1036 и ранее испытанным ингибитором MEK1/2 PD0325901 позволяет добиться

устойчивого противоопухолевого эффекта. Эти данные могут служить предпосылкой новых клинических исследований для терапии опухолей оболочек периферических нервов.

### **Апробация работы**

Основные результаты работы были представлены на следующих конференциях: AACR-NCI-EORTC Molecular Targets and Cancer Therapeutics Conference (2017, Филадельфия, США), XI Международная Пироговская научная медицинская конференция студентов и молодых учёных (2016, Москва), 106<sup>th</sup> American Association for Cancer Research annual meeting (2015, Филадельфия, США), 26<sup>th</sup> Neurofibromatosis (NF) Conference (2013, Монтерей, США), 19<sup>th</sup> Fox Chase Cancer Center Postdoctoral and Student Conference (2013, Филадельфия, США).

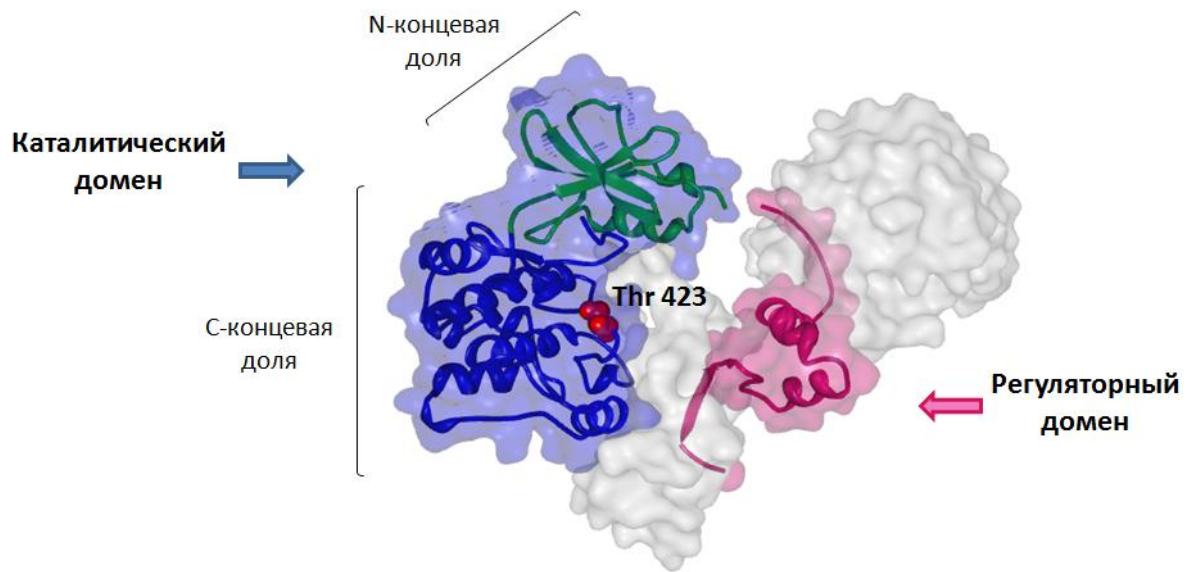
## 2. Обзор литературы

### 2.1. p21-Активируемые киназы: классификация, строение и механизмы активации

p21-Активируемые киназы (p21-activated kinases, PAK) относятся к семейству Ste20-подобных протеинкиназ и осуществляют регуляцию базовых клеточных процессов в эукариотических клетках в ответ на большое количество внешних и внутриклеточных сигналов [22, 23, 26]. Положение PAK в цепи сигнальной трансдукции понятно из названия – эти протеинкиназы опосредуют передачу стимулов от малых (~21 кДа) G-белков RHO (RAC1 и CDC42), к другим сигнальным молекулам. Подсемейство из шести серин/треониновых протеинкиназ PAK, обнаруженных в клетках млекопитающих, разделяют на две группы в соответствии со строением белков и механизмами регуляции их активности. Наиболее хорошо изученная I группа PAK включает три члена: PAK1, PAK2 и PAK3; II группа включает PAK4, PAK5 и PAK6 [27].

Белки подсемейства PAK имеют сходную структуру, но различное распределение в органах и тканях. PAK2 и PAK4 продуцируют все клетки организма, PAK3 и PAK5 - преимущественно клетки головного мозга. Наиболее высокий уровень экспрессии *PAK1* характерен для клеток мозга, селезёнки и мышечной ткани. PAK6 локализована в семенниках и предстательной железе, а также головном мозге, почках и плаценте [39-41]. Интересно, что *PAK5* и *PAK6* редко экспрессируются в одних и тех же тканях, что может свидетельствовать о взаимозамещаемости функций этих киназ.

p21-Активируемые киназы – это мультидоменные белки, содержащие С-концевой каталитический домен, в котором расположен активный центр фермента, и регуляторный домен на N-конце.



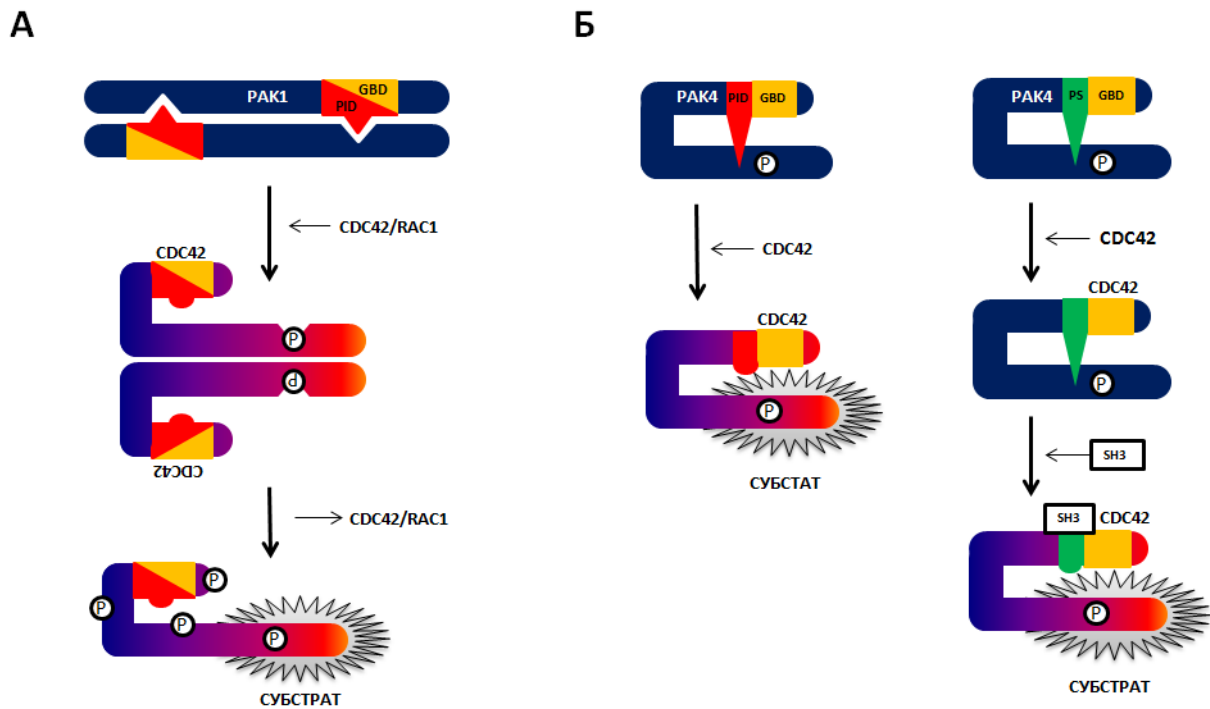
**Рисунок 1. Кристаллическая структура димера PAK1(PDB ID: 1F3M) [28].**

Каталитический (киназный) домен PAK имеет характерную для серин/треониновых киназ двухдольную структуру (Рис. 1). N-концевая доля отвечает за присоединение АТФ, С-концевая – за присоединение белкового субстрата, катализ осуществляется при участии аминокислотных остатков в связующем шарнирном участке [29]. Аминокислотные последовательности каталитических доменов высоко гомологичны у изоформ внутри групп и совпадают лишь на 54% в разных группах PAK [30].

Строение регуляторных доменов PAK1/2/3 отличается от PAK4/5/6, также как и механизмы регуляции активности в двух группах (Рис. 2). У PAK I группы (PAK1/2/3) регуляторный домен содержит сайт для связывания с малыми ГТФазами RAC1 и CDC42, так называемый домен GBD (p21-GTPase binding domain), и автоингибиторный домен PID (PAK inhibitory domain). PAK I группы в неактивном состоянии представляют

собой гомодимер (Рис. 1), в котором Р1D одной молекулы РАК связан с каталитическим доменом другой (Рис. 1, 2). Присоединение активных RAC1 или CDC42 к домену GBD приводит к реорганизации димера, фосфорилированию каталитического домена по остатку треонина [Thr423] и активации РАК I группы [23, 31]. Последующее фосфорилирование по нескольким сайтам стабилизирует «открытую» активную конформацию РАК. Регуляторный домен РАК также включает несколько последовательностей, богатых пролином, для связывания с белками, содержащими домен SH3 (SRC homology 3, гомолог SRC 3) [22]. К таким белкам относятся адаптерные белки NCK и GRB2, а также фактор обмена нуклеотидов PIX (РАК-interacting exchange factor). Присоединение этих факторов необходимо для перемещения РАК к клеточной мембране и фокальным комплексам [22, 32]. Наряду с ГТФаза-зависимой активацией для РАК I группы описано несколько дополнительных регуляторных механизмов, связанных с посттрансляционной модификацией РАК [33-35], белок-белковыми взаимодействиями и взаимодействием с фосфолипидами [23, 36, 37].

Механизм активации РАК II группы в настоящее время является предметом научных дискуссий. В отличие от РАК I группы, РАК4/5/6 обладают очень низкой аффинностью к RAC1 [27], а каталитический домен РАК II группы постоянно фосфорилирован [38]. Очевидно, для этих протенинкиназ характерен аллостерический механизм регуляции. Ранее считалось, что РАК II группы (за исключением РАК5 [39]) не содержат в своём составе функционального автоингибиторного домена, а взаимодействие с CDC42 определяет локализацию РАК4/5/6 внутри клетки [40]. Однако в двух недавних независимых исследованиях были обнаружены N-концевые автоингибиторные последовательности в составе РАК4 (Рис. 2Б).



**Рисунок 2. Механизмы регуляции активности I и II групп PAK.**

А) Модель ГТФаза-зависимого механизма активации PAK1/2/3

Б) Две модели активации PAK4

Первая модель активации предполагает наличие PID в регуляторном домене PAK4. В соответствии с этой гипотезой, PID ингибирует каталитическую активность киназного домена той же молекулы. Связывание CDC42 приводит к разрешению неактивной конформации белка [38]. Согласно альтернативной модели, в регуляторном домене PAK4 расположен псевдосубстратный участок (Pseudosubstrate, PS), который перекрывает активный центр киназы, препятствуя её активации. Взаимодействие с белками, содержащими SH3 домен, высвобождает псевдосубстратный участок из активного центра, что приводит к увеличению его каталитической активности [41]

Белки двух групп PAK выполняют индивидуальные и перекрывающиеся функции, которые играют фундаментальную роль в

различных клеточных процессах, в частности, морфогенезе и подвижности, пролиферации и программируемой клеточной гибели [42]. Патологическое изменение РАК-зависимой сигнальной трансдукции может приводить к нарушению клеточного гомеостаза и развитию ряда неврологических заболеваний, а также способствовать росту и метастазированию злокачественных опухолей [23, 26, 42].

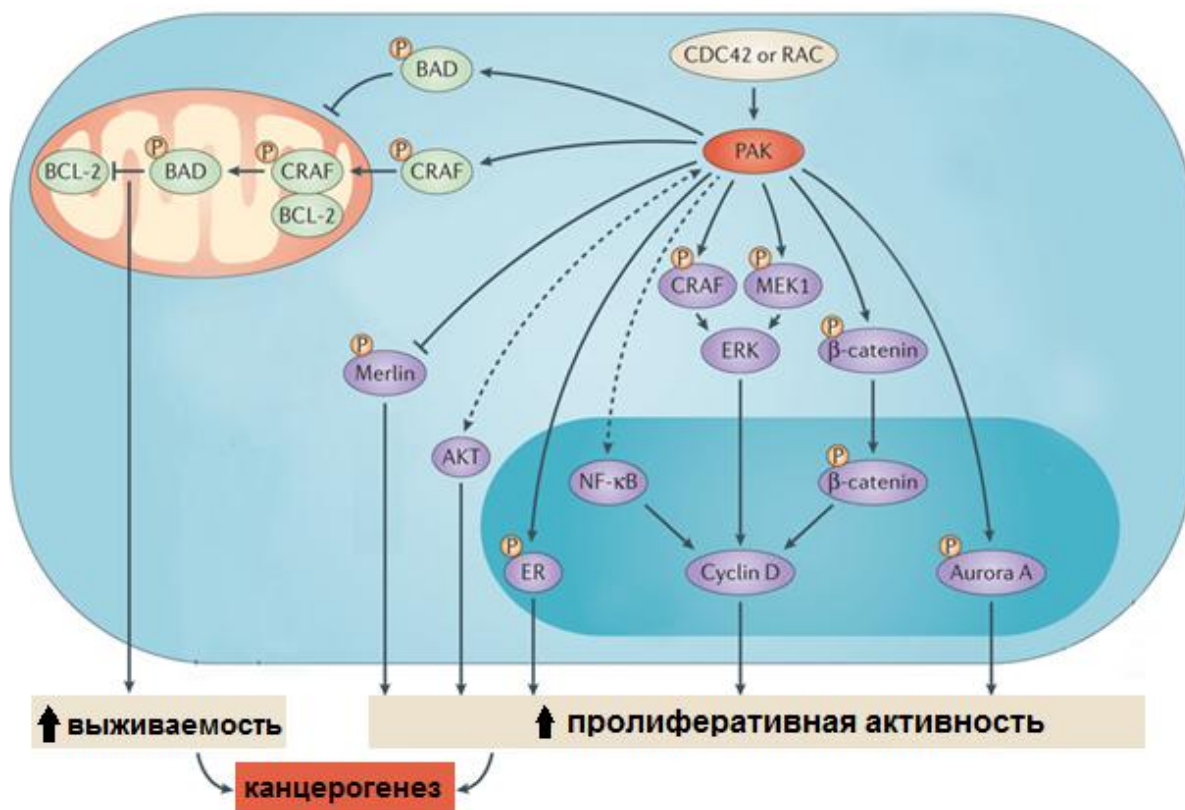
## **2.2. Роль p21-активируемых киназ в росте и распространении злокачественных опухолей**

### **2.2.1. Регуляция клеточной пролиферации и апоптоза**

Согласно литературным данным, для большинства типов клеток увеличение экспрессии генов и активности РАК способствует пролиферации клеток, в то время как генетический нокаут и фармакологическое ингибирование РАК, наоборот, препятствует клеточному делению (возможное исключение – РАК2) [27, 43, 44].

Было показано, что в некоторых типах клеток белки подсемейства РАК играют важную роль в регуляции митоген-активируемого киназного (mitogen-activated protein kinase, MAPK) каскада MEK>ERK, а также PI3K>PKB/АКТ каскада - классических путей проведения сигналов от ростовых факторов. Зависимость от этих сигнальных путей характерна для многих видов злокачественных опухолей. Компоненты MAPK каскада MEK и CRAF являются прямыми субстратами РАК (Рис. 3). Предполагают, что фосфорилирование этих белков p21-активируемыми киназами ведёт к активации MAP-киназы ERK и, как следствие, увеличению уровня циклина D1 – одного из важнейших движителей митотического цикла [23, 45]. Кроме этого, очевидно, киназы РАК выполняют функцию адаптерных белков и участвуют в сборке и стабилизации ферментного комплекса RAF-MEK [46]. Аналогично, РАК являются вспомогательными белками для протеинкиназы B (protein kinase

В, PKB/АКТ) и обеспечивают её околочелювбранное расположение и взаимодействие с активирующими ферментами [47].



**Рисунок 3. Роль РАК в регуляции выживаемости и пролиферативной активности раковых клеток.**

Недавно была обнаружена взаимосвязь p21-активируемых киназ с каноническим (зависимым от  $\beta$ -катенина) путём сигнализации [48-50]. Сигнальный каскад Wnt> $\beta$ -катенин отвечает за контроль программ генной экспрессии, связанных с дифференцировкой и морфогенезом, а также клеточной пролиферацией. Увеличение белкового уровня  $\beta$ -катенина в клетках и его ядерная локализация являются неблагоприятными прогностическими признаками для многих онкологических заболеваний [51, 52]. Было показано, что фосфорилирование киназами РАК стабилизирует  $\beta$ -катенин и способствует его накоплению и перемещению



в ядро. В ядре  $\beta$ -катенин запускает транскрипцию ряда генов, в том числе, генов-активаторов опухолевого роста *MYC* и *CCND1*, кодирующего циклин D1 [48].

РАК фосфорилируют белок-супрессор опухолевого роста мерлин (Merlin), нарушение функций которого служит причиной развития доброкачественных опухолей ЦНС при нейрофиброматозе II типа. Фосфорилирование мерлина вызывает резкое увеличение подвижности молекулы и переход в открытую конформацию [53-56], что подавляет супрессорную функцию белка [57].

К мишеням РАК относятся такие важные регуляторы клеточного цикла как киназа Aurora A (Aurora kinase A, AURKA) и Polo – подобная киназа 1 (Polo-like kinase 1, PLK1), а также ядерные эстрогеновые рецепторы (Estrogen receptors, ER) [58-60]. Показано также, что РАК активируют сигнальный путь NF- $\kappa$ B [61, 62], однако, механизм регуляции на сегодняшний остаётся неизученным (Рис. 5).

Для некоторых членов подсемейства РАК описана негативная регуляция программируемой клеточной смерти. Этот эффект связан с фосфорилированием агониста апоптоза BAD (Bcl-2-associated death promoter) [63]. Фосфорилирование BAD предотвращает его взаимодействие с анти-апоптотическим белком BCL2 и передачу сигналов клеточной гибели. РАК осуществляет модификацию BAD двумя способами. Во-первых, активация CRAF, опосредованная РАК, инициирует перемещение CRAF в митохондрию, где CRAF связывает и фосфорилирует BAD [63-65]. С другой стороны, BAD является прямым субстратом РАК [63].

В дополнение интенсификации роста новообразований за счёт передачи митогенных и антиапоптотических стимулов, p21-активируемые киназы могут играть значимую роль в процессах инвазии и

метастазирования злокачественных опухолей путём участия в реаранжировке подвижных частей цитоскелета.

### **2.2.2. Регуляция клеточной миграции и инвазии**

Наиболее подробно описанные физиологические эффекты РАК связаны с их влиянием на морфологию и подвижность клеток. Интродукция РАК увеличивает скорость миграции клеток [66, 67], и, согласно опубликованным данным, сигнализация РАК вносит вклад в метастатическое распространение некоторых опухолей [68-70].

Направленная миграция клеток представляет собой непрерывное чередование фаз выдвижения псевдоподий, закрепления, перемещения тела и подтягивания отстающего края [71]. Большой объем экспериментальных данных показывает, что киназы подсемейства РАК играют важнейшую роль в динамической координации этих процессов [72-74].

РАК осуществляют контроль протрузионной активности клеток посредством фосфорилирования LIM-киназы (LIMK) [72]. Активная LIM-киназа фосфорилирует белок кофилин и ингибирует его способность к дроблению и деполимеризации F-актина. Таким образом, РАК стабилизирует актиновые филаменты в лидирующем конце клетки, что необходимо для формирования клеточных протрузий – ламеллоподий.

Белки подсемейства РАК участвуют в создании, созревании, росте и распаде фокальных контактов. Один из важных молекулярных механизмов РАК-зависимой регуляции связан с фосфорилированием адаптерного белка паксиллина – центрального компонента фокальных комплексов [73]. Фосфорилирование паксиллина ускоряет разборку фокальных адгезий, что увеличивает протрузионную активность, а также скорость открепления и подтягивания отстающего конца. Кроме этого, РАК регулирует активность миозина II посредством фосфорилирования его легких цепей

[74]. Миозин II участвует в распластывании, адгезии и приложении силы к адгезивным контактам. Миозин II также входит в состав актомиозиновых пучков – стресс-фибрилл, сокращение которых важно для перемещения тела клетки и потягивания отстающего края.

Участие в реорганизации экстрацеллюлярного матрикса - ещё одна функция РАК, которая может иметь важное значение для инвазии и метастазирования клеток злокачественных новообразований. Экспериментальные данные позволяют предположить, что РАК контролируют выброс матриксных металлопротеиназ (matrix metalloproteinases, MMP), разрушающих внеклеточную соединительную ткань [75]. Показано, что РАК регулируют экспрессию *MMP* во многих типах опухолей. Для некоторых из них была установлена взаимосвязь клеточной инвазии и миграции с уровнем экспрессии *РАК* [76-81].

Таким образом, p21-активируемые киназы вносят огромный вклад в регуляцию роста и движения эукариотических клеток, и, в то же время, их активация может быть признаком злокачественности опухолей человека. Белки подсемейства РАК не являются онкогенными белками и не инициируют появление новообразований. Тем не менее, во многих типах опухолей было обнаружено увеличение копий генов *РАК* и белкового продукта, а также высокая активность РАК [68, 82]. Среди всех p21-активируемых киназ увеличение уровня и активности РАК1 в клетках наиболее часто ассоциируют со злокачественным фенотипом [42]. В связи с этим в настоящее время исследуется возможность использования РАК в качестве терапевтических мишеней для ряда онкологических заболеваний и ведётся разработка специфических ингибиторов РАК [24]. В большей степени это относится РАК I группы, механизмы активации и физиологические роли которых изучены более детально [25].

### **2.3. Ингибиторы p21-активируемых киназ I группы (РАК1/2/3) и их использование в доклинических испытаниях**

Понимание процессов регуляции активности и катализа РАК1/2/3 (Глава 2.1.) позволяет предложить две стратегии фармакологического ингибирования этих киназ: блокировка фосфотрансфера в активном сайте (АТФ-конкурентное ингибирование) и использование уникальных регуляторных механизмов РАК (аллостерическое ингибирование).

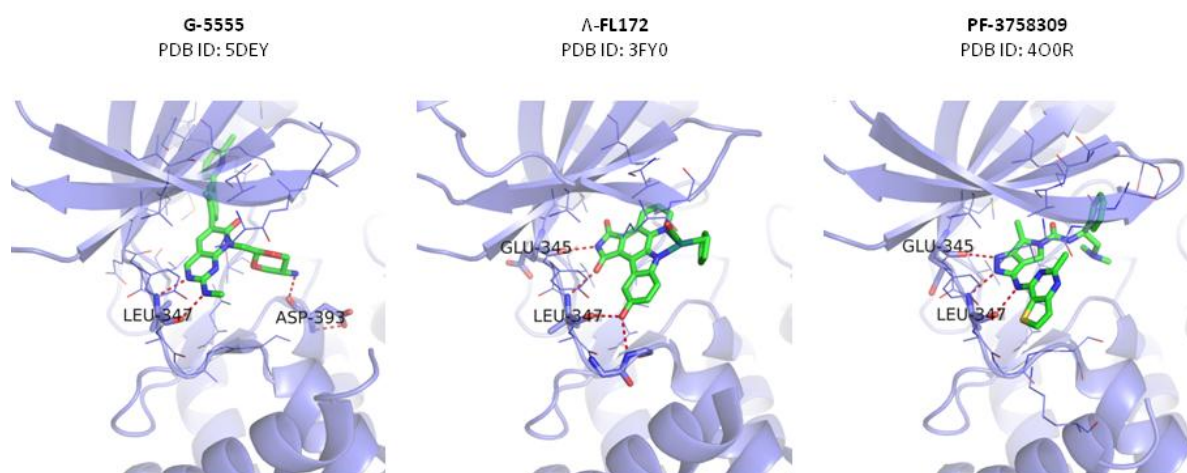
#### **2.3.1. АТФ-конкурентные ингибиторы p21-активируемых киназ**

АТФ-конкурентные ингибиторы киназ, как правило, занимают рибозосвязывающий карман активного центра фермента, делая его недоступным для молекул АТФ [83]. Создание таких лигандов для РАК представляет собой непростую задачу из-за высокой пластичности их киназных доменов, а также подвижности АТФ-связывающего участка (Рис. 4) [28, 29]. Тем не менее, на сегодняшний день было создано несколько эффективных АТФ-конкурентных ингибиторов РАК (Рис. 5), большая часть которых представляет собой ингибиторы РАК I группы или ингибиторы всех изоформ РАК. Отсутствие внутривидовой специфичности этих лигандов обусловлено высокой гомологичностью каталитических доменов РАК [24].

##### Индолокарбазолы

Алкалоид стауроспорин (и его аналог K252) представляет собой АТФ-конкурентный ингибитор киназ широкого спектра с высокой аффинностью к Ste20-подобным протеинкиназам, включая РАК [84, 85]. Благодаря сходству его строения с молекулой АТФ, стауроспорин эффективно ингибирует >70% всех протеинкиназ [84-86]. Несмотря на большую ингибиторную силу, возможности использования стауроспорина ограничены его неудовлетворительной субстратной специфичностью. Для увеличения специфичности к РАК1, на основе стауроспорина был создан

ингибитор  $\Lambda$ -FL172 – октаэдрический комплекс рутения с жёсткой структурой, занимающий объёмный АТФ-связывающий карман РАК1 (Рис. 2 и 3) [87].  $\Lambda$ -FL172 продемонстрировал способность к эффективному ингибированию активности РАК1/2/3 и субстратную специфичность, значительно превышающую специфичность стауроспорина, однако, на сегодняшний день отсутствуют данные о клеточной активности и фармакокинетике этого ингибитора.



**Рисунок 4. Кристаллические структуры комплексов РАК1 с АТФ-конкурентными ингибиторами РАК.**

#### Пирролопиразолы

PF-3758309 – единственный ингибитор РАК, допущенный к клиническим испытаниям [88]. Хотя PF-3758309 был создан как ингибитор РАК4, это соединение оказалось эффективным в отношении всех изоформ подсемейства РАК, а также спектра нецелевых киназ (Рис. 4 и 5). Этот ингибитор пригоден для перорального приема и показал выраженную противоопухолевую активность в ряде доклинических исследований с использованием ксенографтных моделей меланомы, рака кишечника, груди, простаты и рака лёгкого [48, 88-93]. Так как нецелевая

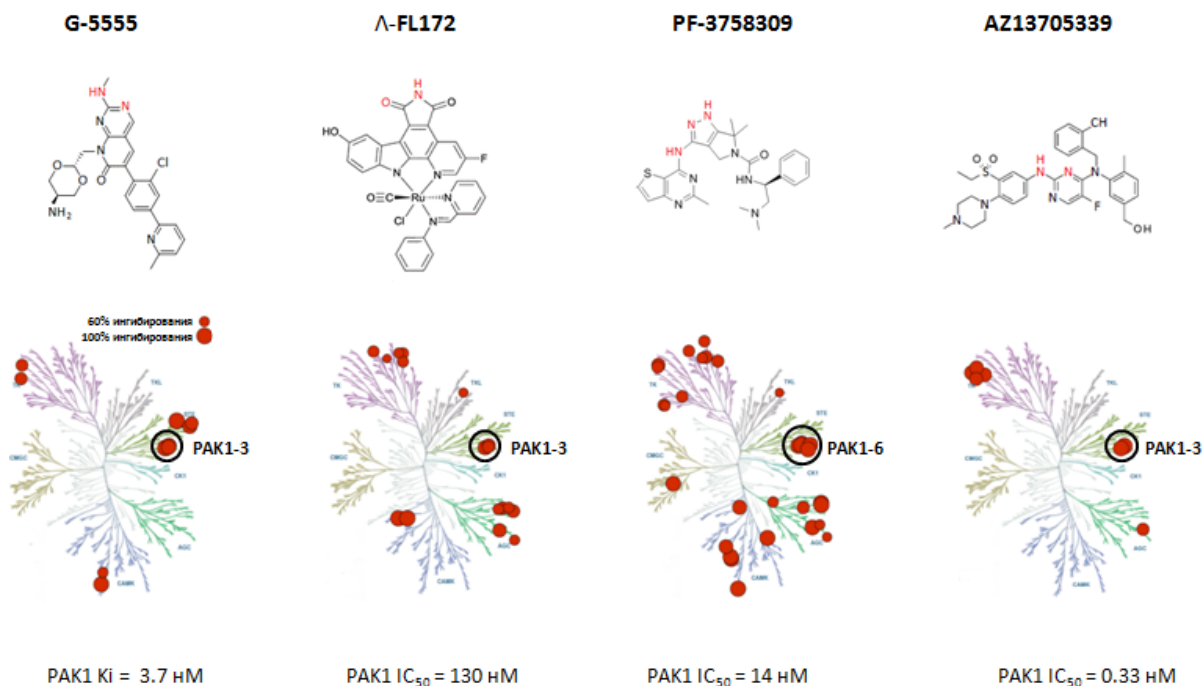
ингибиторная активность PF-3758309 может иметь значительное влияние на рост и выживаемость опухолевых клеток, данные биологические эффекты невозможно приписать индивидуальному ингибированию РАК.. Клинические испытания PF-3758309 были завершены из-за неудовлетворительной биодоступности препарата и нежелательных побочных эффектов.

#### Аминопиримидины

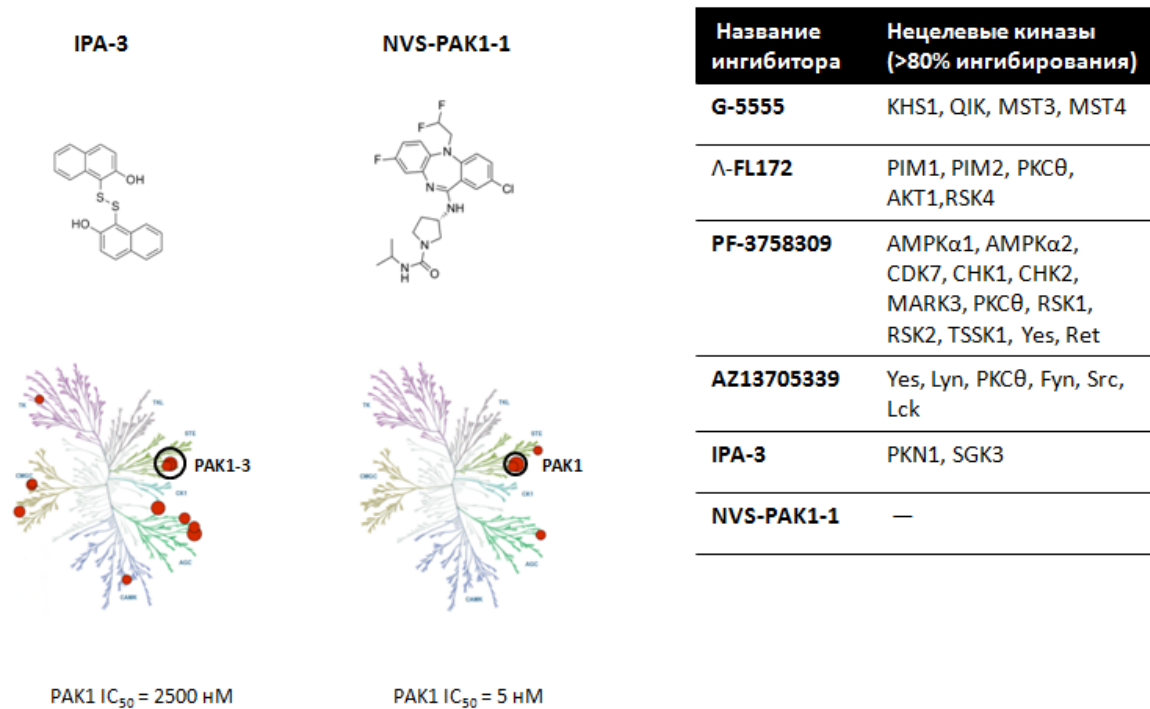
Низкомолекулярные ингибиторы на основе пиридо[2,3-d]пиримидина были изначально созданы для лечения неврологических заболеваний. Впоследствии эти препараты были успешно использованы в качестве противораковых терапевтических агентов. Один из таких агентов, Frax597 (PDB ID: 4EQC), эффективно ингибирует РАК1 ( $IC_{50} = 7.7$  нМ), и ряд других мишеней, главным образом, рецепторные тирозинкиназы [94]. Этот ингибитор пригоден для перорального использования и был ранее испытан в модели ортотопической шванномы при нейрофиброматозе II типа [94], менингиомы [95] и плоскоклеточного рака кожи [93].

Другой ингибитор этого химического класса, Frax486, был изучен в качестве возможного лекарственного препарата для терапии синдрома Мартина-Белл – генетического заболевания, обусловленного инактивацией гена *FMR1* [96]. Frax486 обладает выраженной ингибиторной активностью (РАК1  $IC_{50} = 8.25$  нМ) и уникальными фармакокинетическими свойствами при подкожном введении, включая способность к проникновению через гематоэнцефалический барьер. В исследовании с использованием мышей, нокаутных по *Fmr1*, одной подкожной инъекции Frax486 оказалось достаточно для смягчения симптомов заболевания на клеточном и поведенческом уровнях [96].

## АТФ-конкурентные ингибиторы PAK



## Аллостерические ингибиторы PAK



**Рисунок 5. Структура, субстратная специфичность и активность низкомолекулярных ингибиторов PAK.**

Атомы молекул АТФ-связывающих ингибиторов, образующие водородные связи в шарнирном участке активного центра РАК, выделены красным цветом.

Киназы-мишени ингибиторов РАК показаны красными кружками на «киномном дереве».

РАК1 IC<sub>50</sub> – концентрация полумаксимального ингибирования РАК1

РАК1 Ki – константа ингибирования РАК1

Усовершенствование препаратов группы пирролопиразолов привело к созданию нового ингибитора Frax1036 (PDB ID:5DFP) с улучшенной кинемной селективностью [95]. Frax1036 представляет собой удобный инструмент как для индивидуальной, так и для сочетанной терапии опухолей различного генеза в доклинических испытаниях *in vitro* и *in vivo* [95, 97-99].

К недостаткам этого ингибитора можно отнести его слабую растворимость в воде. Кроме этого, при детальном изучении свойств Frax1036 было выявлено нецелевое ингибирование калиевых каналов [100]. В попытке улучшить фармакологические свойства этого ингибитора, на основе Frax1036 недавно был создан препарат G-5555 с желаемой клеточной активностью и растворимостью (Рис. 4) [100]. Согласно литературным данным, на сегодняшний день G-5555 является наиболее «чистым» АТФ-конкурентным ингибитором РАК1/2/3 (Рис. 5).

#### Бис-анилинопиримидины

В недавнем докладе были описаны низкомолекулярные соединения с исключительной способностью к ингибированию РАК1 [101]. Один из модельных препаратов, AZ13705339, ингибирует РАК1 *in vitro* с IC<sub>50</sub> < 1 нМ. К нецелевым мишеням относятся несколько киназ других семейств, в частности, Src (Рис 5). Аналогичный препарат этой серии, AZ13711265, проявил лучшие фармакокинетические свойства в сравнении с AZ13705339 и был предложен для испытаний *in vivo*.



### 2.3.2. Аллостерические ингибиторы p21-активируемых киназ

Альтернативой АТФ-конкурентным ингибиторам служат неконкурентные аллостерические ингибиторы, связывающиеся с ферментами вне их активного сайта [83]. Аллостерические ингибиторы РАК достигают большей субстратной специфичности по сравнению с конкурентными ингибиторами благодаря тому, что они взаимодействуют с уникальными областями целевых молекул. Такие ингибиторы, однако, характеризуются меньшей силой, так белковые карманы, с которыми взаимодействуют данные лиганды, недостаточно глубоки и не так богаты лиганд-связывающими аминокислотными остатками, как активный сайт фермента.

#### Нафтолы

IPA-3 (inhibitor of p21-activated kinase 3, ингибитор p21-активируемой киназы 3) – соединение, взаимодействующее с регуляторным N-концевым доменом РАК1/2/3, – был обнаружен в результате направленного поиска неконкурентных ингибиторов РАК1 [102]. Обратимое ковалентное связывание IPA-3 с регуляторным доменом РАК препятствует присоединению ГТФаз и последующему переходу РАК в активную форму [103]. Такой механизм ингибирования обеспечивает IPA-3 исключительную субстратную специфичность (Рис. 5) и делает его важным инструментом для изучения функций РАК1/2/3 *in vitro*. Однако окислительно-восстановительные свойства IPA-3 в клетках, обусловленные разрушением сульфгидрильной связи, существенно ограничивает использование IPA-3 в клеточных и мышечных моделях. Такой эффект может быть частично сбалансирован посредством использования в качестве отрицательного контроля изомера IPA-3 PIR-3.5 – вещества с окислительно-восстановительными свойствами, подобными IPA-3, но не влияющее на активность РАК [102].

### Дибензодиазепины

Ингибиторы этой группы взаимодействуют с аллостерическим сайтом PAK1, прилежащим к АТФ-связывающему карману, и препятствует связыванию АТФ [104]. Согласно опубликованным данным, оптимизированный ингибитор NVS-PAK1-1 (compound 3, [104]) обладает внутригрупповой субстратной специфичностью, т.е. его способность к ингибированию PAK1, измеренная методом анализа киназной активности *in vitro*, достоверно превышает таковую для PAK2 (Рис. 5). Таким образом, NVS-PAK1-1 представляет собой единственный низкомолекулярный ингибитор, избирательный в отношении PAK1. Несмотря на высокую биохимическую активность, ингибиторная сила NVS-PAK1-1 в клетках оказалась недостаточной для подавления фосфорилирования прямого субстрата PAK1 MEK1 по S298, а также для подавления клеточной пролиферации. Этот феномен можно объяснить функциональной избыточностью изоформ PAK [23].

### Пептидные ингибиторы

В настоящее время пептидные ингибиторы PAK1/2/3 широко используются в качестве инструментов лабораторных исследований. В частности, экспрессия автоингибиторного домена PAK PID (Рис. 1) эффективно подавляет активацию PAK1/2/3. Важно отметить, что PID PAK1 может вызывать арест клеточного цикла независимо от активности PAK1 [105]. Такой эффект, вероятно, обусловлен связыванием PID с белками FMR1 и FRX1, которые стабилизируют ингибитор циклинзависимой киназы p21<sup>waf1</sup> [106, 107]. PID PAK2, однако, не связывается с FMR1/FRX1 и оказывает свой биологический эффект преимущественно за счёт ингибирования PAK1/2/3.

Два других пептидных ингибитора PAK представляют собой TAT-пептиды (GRKKRRQRRRPQ), связанные с аминокислотными мотивами PAK1, взаимодействующими с белком PIX (TAT-PAK18) или NCK (Pak-

НСК). Предполагают, что эти пептиды препятствуют правильной компартментализации РАК1/2/3 за счет нарушения связывания РАК с Р1Х и НСК. Супрессорный эффект ТАТ-РАК18 на рост опухолевых клеток был показан в клеточной модели РАК1-зависимого рака яичника [108], в то время как РаК-НСК эффективно ингибировал подвижность и сократительную способность эндотелиальных клеток [109, 110]

Таким образом, на сегодняшний день существует несколько ингибиторов РАК1/2/3 с различной силой, субстратной специфичностью и механизмом действия. Большая часть этих агентов прошла первичные доклинические испытания на моделях злокачественных опухолей человека, в том числе, на моделях *in vivo*. Результаты таких испытаний свидетельствуют о ведущей роли РАК I группы в развитии некоторых онкологических заболеваний.

Одним из заболеваний, для которых РАК1/2/3 представляют собой потенциальные терапевтические мишени, является нейрофиброматоз I типа [21], однако, к настоящему моменту, эффективность низкомолекулярных ингибиторов РАК в лечении НФ1-ассоциированных опухолей не была оценена, и изучение роли p21-активируемых киназ I группы в патогенезе этих опухолей остаётся актуальной задачей.

## **2.4. Этиология и молекулярные механизмы развития злокачественных опухолей оболочек периферических нервов (MPNST)**

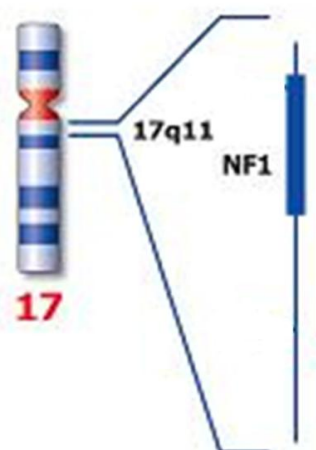
### **2.4.1. Опухоли оболочек периферических нервов при нейрофиброматозе I типа**

Нейрофиброматоз I типа (болезнь Реклингхаузена, НФИ) – самая распространённая наследуемая онкопатология, поражающая нервную систему (OMIM 162200) [111]. Одним из наиболее опасных симптомов НФИ являются плексиформные нейрофибромы (ПНФ) – доброкачественные новообразования оболочек периферических нервов, расположенные внутри нервного сплетения [112]. Такие опухоли, как правило, характеризуются большими размерами и могут сдавливать близлежащие органы, вызывая боль и различные дисфункции. Кроме этого, ПНФ дают начало злокачественным опухолям оболочек периферических нервов (malignant peripheral nerve sheath tumors, MPNST), которые являются самой частой причиной смерти при НФИ [1, 112-114]. В клетках таких злокачественных новообразований наблюдается повреждение не только гена *NF1*, но и других генов важнейших регуляторов клеточного деления [5, 115-117]. Риск развития MPNST на протяжении жизни составляет 7-12% у пациентов с болезнью Реклингхаузена [1]. Эти опухоли часто метастазируют и имеют неблагоприятный прогноз [112, 113].

В настоящее время медикаментозного лечения болезни Реклингхаузена не существует, более того, пациенты с НФИ вынуждены подвергаться многократным хирургическим вмешательствам по удалению опухолей, которые часто рецидивируют [114, 118].

#### 2.4.2. *NF1* – классический онкосупрессорный ген

Развитие нейрофиброматоза I типа связано с повреждением гена *NF1*, локализованного на хромосоме 17q [119] (Рис. 6). Ген *NF1* является чрезвычайно протяженным и сложно организованным. Он имеет длину около 350 кб, состоит из 60 экзонов и экспрессируется, помимо нервной системы, в различных тканях [3, 120]. Частота мутаций гена *NF1* является одной из наиболее высоких при всех известных заболеваниях человека (до  $6,5 \times 10^{-5}$  гамет на поколение, или почти 1 на 10 000 гамет), и примерно 50% случаев заболевания являются спорадическими [3, 121].



**Рисунок 6. Расположение гена *NF1* в 17 хромосоме.**

Инактивации гена *NF1* соответствуют двухударной модели Кнудсона [122]. Все клетки пациентов с болезнью Реклингхаузена (за исключением мозаичных случаев) несут врожденные инактивирующие мутации в одном из аллелей гена *NF1*. В опухолевых клетках наблюдается поражение и второго аллеля (потеря гетерозиготности), что ведет к полному отсутствию активного белкового продукта и развитию клинических проявлений заболевания. Гомозиготы по мутантному *NF1* погибают на эмбриональной стадии развития [123].

### 2.4.3. Нейрофибромин и его роль в Ras-опосредованной сигнальной трансдукции

Ген *NF1* кодирует белок-супрессор опухолевого роста нейрофибромин (neurofibromin 1, NF1) [2]. NF1 продуцируется во многих тканях, но наиболее высокий уровень нейрофибромина наблюдается в нервных клетках и специализированных клетках нейроглии (олигодендроцитах и Шванновских клетках), а также в лейкоцитах [124].

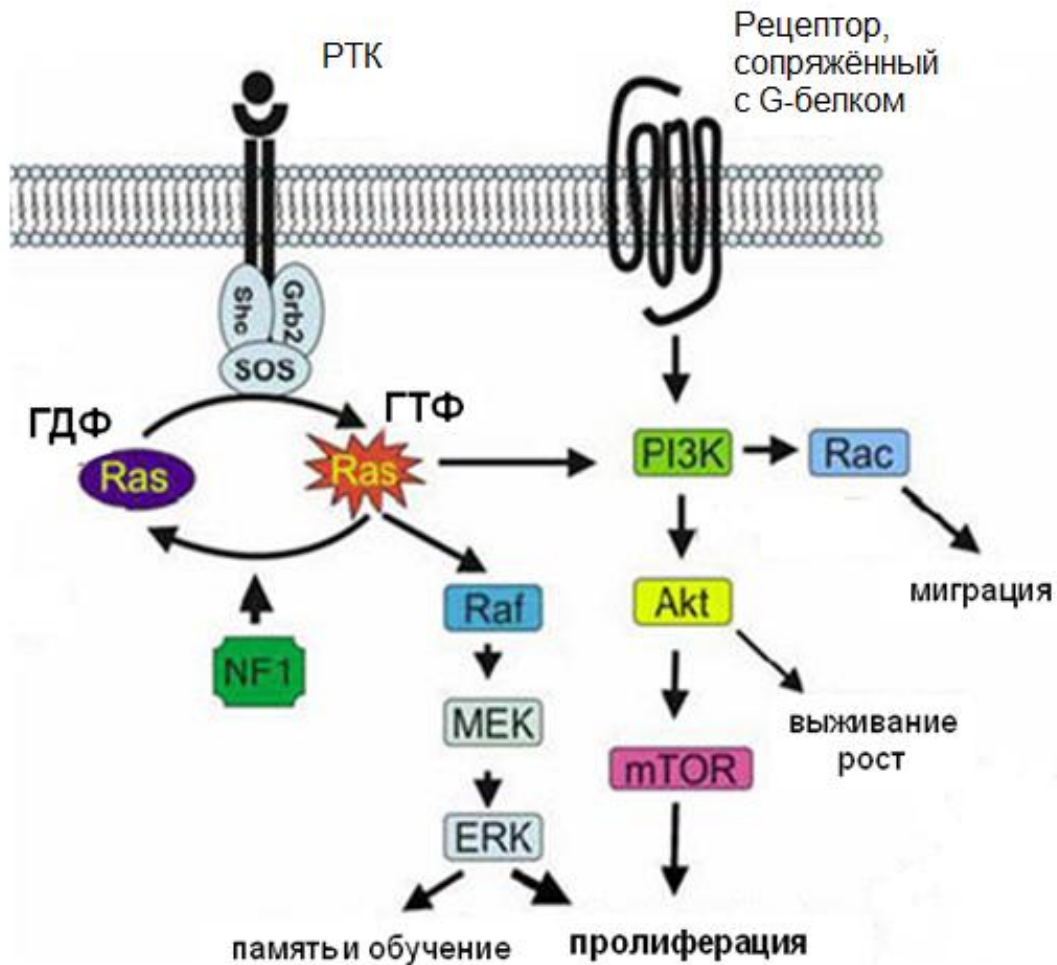
Нейрофибромин - цитоплазматический белок, состоящий из 2818 аминокислот. NF1 содержит в своем составе каталитический GRD домен (GAP-related domain), общий для белков-активаторов ГТФазы GAP [2, 3, 125]. Посредством этого домена нейрофибромин в норме взаимодействует с продуктом протоонкогена *Ras*. Кроме этого, GRD-домен фланкируют два домена IRA (Рис. 7), имеющие сходную последовательность с дрожжевыми белками-ингибиторами Ras (inhibitors of Ras, IRA).



**Рисунок 7. Строение белкового продукта гена *NF1* - нейрофибромина**  
GRD (GAP-related domain) – домен, родственник GAP  
IRA-1, IRA-2 – домены, гомологичные дрожжевым , белкам-ингибиторам Ras.

Ras-белки принадлежат к семейству малых ГТФаз и регулируют клеточный рост и дифференцировку. Они участвуют в трансдукции сигналов, полученных мембранными рецепторами клетки, и, будучи локализованы на внутренней поверхности мембран, тесно контактируют с фосфолипидами и мембранными белками. В активном состоянии ГТФазы Ras связаны с молекулой ГТФ, а в неактивном - с ГДФ. Активация Ras опосредуется рецепторной тирозин киназой (РТК) (Рис. 8). Связывание

экстрацеллюлярной части РТК с ростовыми факторами вызывает сборку рецепторного комплекса, содержащего GEF - фактор обмена гуаниновых нуклеотидов (guanine nucleotide exchange factor), который ускоряет диссоциацию комплекса Ras-ГДФ. Освободившийся от ГДФ белок Ras может присоединить гуанозинтрифосфат и активироваться для дальнейшей передачи сигнала.



**Рисунок 8. Регуляторная роль нейрофибромина в Ras-опосредованной сигнальной трансдукции [126].**

Активный комплекс Ras-ГТФ взаимодействует с серин/треонин киназой Raf и фосфотидилинозитол-3- киназой PI3K, запуская MAPK/ERK и PI3K киназные каскады. Таким образом, белок Ras реализует

трансдукцию митогенных сигналов, передающихся с рецепторов факторов роста и мембранных тирозинкиназ [127-129].

ГТФ-связанная форма Ras медленно переходит в ГДФ-связанную форму за счет присущей белку способности гидролизовать ГТФ. Низкая собственная ГТФазная активность Ras-белков может быть сильно увеличена нейрофибрином и другими GAP-белками. Нейрофибромин повышает константу гидролиза связанного ГТФ и укорачивает время жизни Ras в активном, ГТФ-связанном состоянии, ингибируя его функцию и реализуя свой супрессорный эффект в отношении клеточной пролиферации. Выпадение функции нейрофибромина в клетках, вовлечённых в патогенез НФИ, приводит к развитию ряда клинических проявлений болезни Реклингхаузена, в том числе, нейрофибром [127-129].

Подсемейство ГТФаз Ras включают в себя белки H-Ras, N-Ras и K-Ras, активность каждого из которых регулирует нейрофибромин [130]. Кроме этого, нейрофибромин подавляет активность белков подсемейства R-Ras (R-Ras, R-Ras2/TC21 и M-Ras), родственных «классическим» Ras [130]. Согласно опубликованным данным, клетки MPNST продуцируют одновременно Ras и R-Ras, которые выполняют общие и индивидуальные функции [131]. Таким образом, нейрофибромин контролирует несколько параллельных промитотических сигнальных путей в этих клетках.

#### **2.4.4. Молекулярная генетика опухолей оболочек периферических нервов**

К настоящему времени выяснено, что плексиформные нейрофибромы возникают вследствие потери гетерозиготности по гену *NF1* шванновскими клетками [127, 128, 132]. Считается, что в формировании опухолей периферической нервной системы при болезни Реклингхаузена также играет важную роль и фенотип клеток микроокружения. В частности, было показано, что гетерозиготные по гену



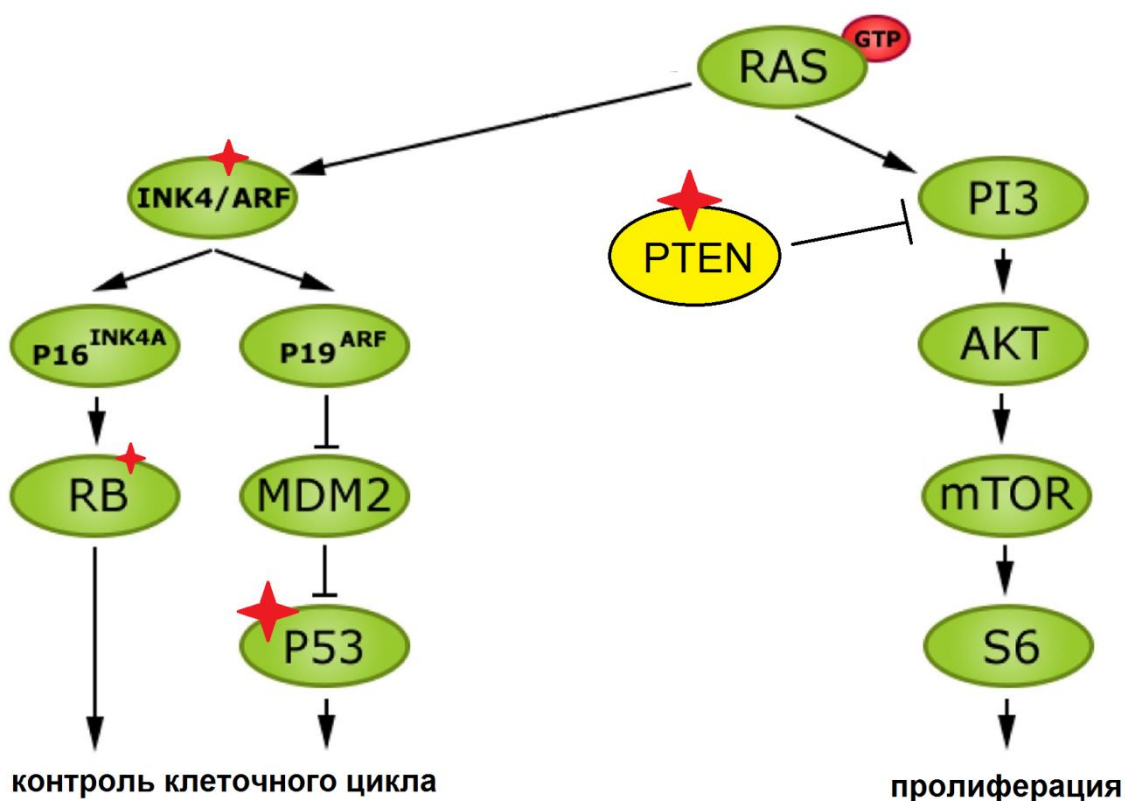
*NF1* тучные клетки инфильтрируют периферические нервы и способствуют развитию плексиформных нейрофибром, что свидетельствует о тесной взаимосвязи леммоцитов с тучными клетками в патогенезе НФІ. [126, 128]. Биаллельная инаktivация гена *NF1* в шванновских клетках, тем не менее, является абсолютно необходимым событием в инициации неопластической трансформации периневральной ткани [126, 133]. Большое количество экспериментальных данных подтверждает, что повреждение гена *NF1* в шванновских клетках (или их предшественниках) является первым этапом нейрофибромогенеза, который вовлекает другие типы клеток в патофизиологический процесс и провоцирует дополнительные трансформации в этих клетках [126, 128, 134]. Накапливая вторичные мутации в протоонкогенах и генах-супрессорах опухолевого роста, плексиформные нейрофибромы могут перерождаться в злокачественные опухоли оболочек периферических нервов (MPNST) [4, 5]. Мутации с потерей функции в гене *NF1* обнаруживают и во многих спорадических (спонтанных) MPNST [11, 135], что позволяет сделать вывод о важнейшей регуляторной роли нейрофибромина в развитии MPNST.

Геном клеток MPNST, наряду с повреждением гена *NF1*, содержит большое количество мутаций, лишь немногие из которых на сегодняшний день охарактеризованы [5]. Одними из первых были обнаружены мутации в онкосупрессорных генах, вовлечённых в контроль клеточного цикла MPNST (Рис. 4).

Генетические перестройки в *CDKN2A*, кодирующем важнейшие «хранители клеточного цикла», - белки p16/INK4A и p19/ARF - наблюдаются в ~50% MPNST [115, 136]. Белок p16/INK4A осуществляет свою онкосупрессорную функцию за счёт ингибирования циклинзависимых киназ CDK4 и CDK6, фосфорилирующих белок-супрессор опухолевого роста RB, в то время как p19/ARF ингибирует

фермент группы E3 системы убиквитин-зависимого протеолиза MDM2, маркирующий транскрипционный фактор p53 для протеосомной деградации (Рис. 9). Делеции и другие мутации в *TP53*, гене p53, обнаруживают в ~75% MPNST [130], а в ~25% MPNST наблюдают отсутствие экспрессии *RB* [137, 138].

В геноме MPNST также были обнаружены инактивирующие мутации в генах-супрессорах опухолевого роста, влияющие на другие сигнальные пути, в частности, PI3K>AKT>mTOR>S6. Так, потеря белка PTEN, негативного регулятора PI3K, наблюдается в ~60% MPNST [117, 139] (Рис. 9).



**Рисунок 9. Белки-супрессоры опухолевого роста, вовлечённые в злокачественное перерождение опухолей оболочек периферических нервов.**

Белки, гены которых часто повреждены в клетках MPNST, отмечены красной четырёхконечной звездой.

Эпигенетическая инактивация опухолевых супрессоров также играет значимую роль в патогенезе MPNST. Это было продемонстрировано в недавнем исследовании, показавшем выключение гена *RASSF1A*, кодирующего взаимодействующий с Ras белок RASSF1A, посредством метилирования ДНК [140]. Кроме этого, соматические мутации в генах *SUZ12* и *EED*, кодирующих белки группы Polycomb (Polycomb-group proteins, PcG), были обнаружены в спорадических MPNST, так же как в MPNST у пациентов с НФИ [141-143]. Белки SUZ12 и EED входят в состав репрессорного комплекса PRC2 (polycomb repressive complex 2), метилирующего лизиновые остатки гистонов и, таким образом, поддерживающего хроматин в неактивном состоянии [144].

В качестве возможных активаторов роста MPNST были предложены некоторые ростовые факторы и их рецепторы. В частности, в MPNST была обнаружена амплификация генов рецептора фактора роста эпидермиса (epidermal growth factor receptor, EGFR), нейрегулина-1 (neuregulin-1, NRG1), фактора роста тромбоцитов (platelet-derived growth factor, PDGF), корцептора рецептора фактора роста эпидермиса erbB2, рецептора ранних про-В-клеток KIT и рецептора фактора роста гепатоцитов MET [130]. На сегодняшний день неизвестно, существуют ли отдельные группы MPNST, которые зависят от тех или иных ростовых факторов, или каждый из ростовых факторов играет индивидуальную роль в биологии одной и той же опухоли.

Цитогенетический анализ и исследования с использованием матриксной геномной гибридизации показали, что клетки MPNST часто имеют весьма сложный гиподиплоидный или почти триплоидный геном [5]. Такая геномная вариабельность в значительной степени затрудняет поиск повторяющихся изменений копийности генов-двигателей злокачественной трансформации. Тем не менее, в MPNST были обнаружены потери участков хромосом 1p, 9p, 11, 12p, 14q, 17q, 18, 22q, X

и Y, а также увеличение количества 7, 8q, и 15q [5]. Некоторые хромосомные перестройки затрагивают участки с известными генами-супрессорами роста MPNST, в частности, 17q (ген *NF1*) и 9p (*CDKN2A*), однако, для большинства хромосомных aberrаций до сих пор не удалось определить «драйверные» онкосупрессорные гены.

Клетки MPNST, как правило, слабо дифференцированы и утрачивают морфологические признаки и белковые маркеры зрелых шванновских клеток [11]. На сегодняшний день неизвестно, подчиняются ли НФИ-ассоциированные MPNST, спорадические MPNST и MPNST, индуцированные облучением, одним и тем же законам развития. В пользу этой гипотезы говорит обнаружение некоторых общих патогенетических механизмов в спонтанных и НФИ-ассоциированных MPNST (напр., амплификация гена *EGFR*, активация каскадов MAPK/ERK и PI3K>АКТ>mTOR). Как обсуждалось выше, инактивирующие мутации в гене *NF1* характерны и для MPNST у пациентов без нейрофиброматоза I типа [11]. В одном из исследований с использованием полногеномного секвенирования мутации в *NF1* были обнаружены в 82% протестированных MPNST (18 из 22) [142]. Нельзя исключить, что геномы злокачественных опухолей оболочек периферических нервов с интактным *NF1* содержат мутации, нарушающие передачу сигналов по каскадам, регулируемым NF1. Несмотря на многократные попытки [132], индивидуальные особенности транскриптомов подтипов MPNST к настоящему моменту не удалось обнаружить. Таким образом, можно сделать вывод, что механизмы, управляющие развитием спонтанных и НФИ-ассоциированных MPNST, сходны.

## **2.5. Современные подходы к терапии MPNST. Адресная терапия MPNST.**

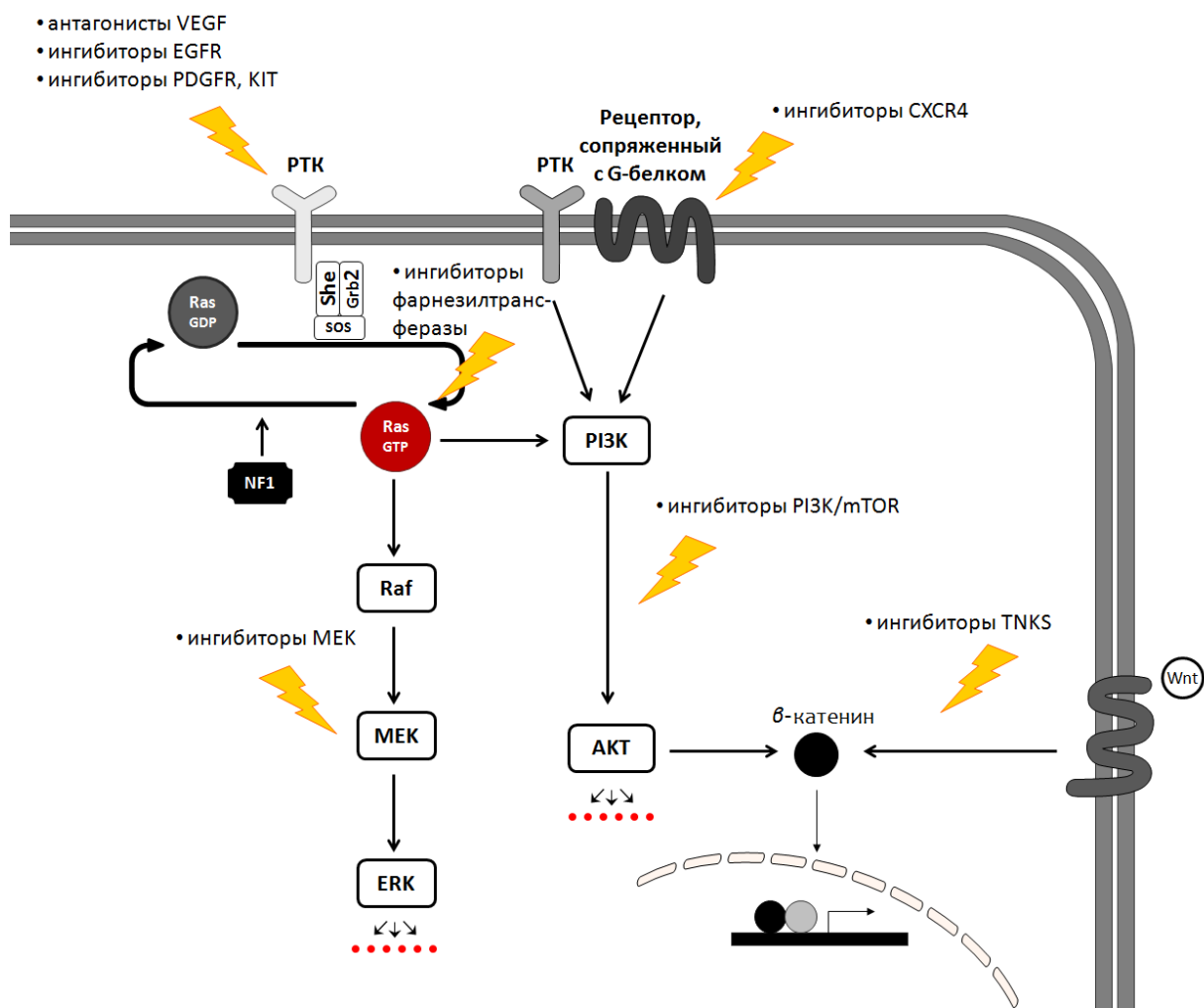
В настоящее время для терапии злокачественных опухолей оболочек периферических нервов, так же как и для лечения сарком других типов, используют традиционные методы противораковой терапии: химиотерапия, лучевая терапия и хирургическое лечение. Единственная известная радикальная терапия MPNST – тотальная резекция опухоли с широкими гистологически чистыми краями. Выполнение такой резекции, однако, часто не представляется возможным из-за размера опухоли, её положения и наличия метастазов [145]. Значение адъювантной радиотерапии на сегодняшний день не определено. Хотя радиолечение показано пациентам с MPNST высокой степени злокачественности, его проведение не позволяет улучшить прогноз жизни таких пациентов [146]. Значение химиотерапии также не определено. Клинические испытания с использованием доксорубицина, ифосфомида и итопозида позволили достичь стабилизации заболевания в группе пациентов с локализованными, но не метастатическими MPNST [147]. Для пациентов с рецидивными, неоперабельными и метастатическими MPNST терапевтические опции на сегодняшний день отсутствуют.

В связи с неудовлетворительными результатами традиционных методов лечения, в настоящее время ведётся активный поиск потенциальных агентов направленной (молекулярно-прицельной, адресной) терапии MPNST (Рис. 10).

### **2.5.1. Ингибиторы рецепторных тирозинкиназ**

В качестве агентов адресной терапии опухолей оболочек периферических нервов были предложены ингибиторы рецепторных тирозинкиназ (РТК), количество и активность которых часто увеличены в

в опухолевых клетках [148] , в том числе, в клетках MPNST (Глава 2.3.4.). Эрлотиниб, ингибитор EGFR, был первым адресным препаратом, использованным во I/II фазе клинических испытаний для лечения MPNST [149]. Это испытание было создано на основании полученных ранее результатов использования ингибиторов EGFR в мышинной модели MPNST [150], которые, однако, не удалось воспроизвести при лечении MPNST человека ( Таблица 1).



**Рисунок 10. Агенты адресной терапии злокачественных опухолей оболочек периферических нервов.**

Аналогично, иматиниб (ингибитор PDGFR, KIT) [151] и сорафениб (неселективный ингибитор РТК) [152] оказались неэффективны для терапии MPNST, несмотря на их выраженную противоопухолевую активность в доклинических исследованиях [153-155].

Блокаторы ангиогенеза - антитела и низкомолекулярные ингибиторы фактора роста эндотелия (VEGF) - также не показали значимого эффекта (Таблица 1). Вероятно, устойчивость к ингибиторам РТК и их лигандов развивается посредством компенсаторных сигнальных путей, активируемых «выключением» РТК.

**Таблица 1. Завершенные и текущие клинические испытания агентов адресной терапии MPNST и плексиформных нейрофибром.**

Научная работа или номер испытания на ClinicalTrials.gov	Испытуемый препарат	Механизм действия препарата	Дизайн испытания и клинико-патологические характеристики образцов	Размер выборки	Результаты
Albritton et al. [149]	Эрлотиниб	НМИК против EGFR	II фаза MPNST	20	Отсутствие ОО, средняя БПВ = 2 месяца, средняя ОВ = 4 месяца
Widemann et al. [156]	Типифарниб	Ингибитор фарнезил-трансферазы	I фаза Солидные рефракторные опухоли, НФИ с ПНФ	17 НФИ, 23 солидные опухоли	Отсутствие ОО
Robertson et al. [157]	Иматиниб	НМИК против PDGFR, KIT	II фаза НФИ с ПНФ	36	ОО = 17%
Maki et al. [152]	Сорафениб	НМИК против VEGF, Raf	II фаза Саркомы мягких тканей	12 MPNST (всего 122)	Отсутствие ОО у пациентов с MPNST
Kim et al. [158]	Сорафениб	НМИК против VEGF, Raf	I фаза НФИ с ПНФ	9	Отсутствие ОО
Chugh et al. [151]	Иматиниб	НМИК против PDGFR, KIT	II фаза Саркомы мягких тканей	7 MPNST (всего 185)	Отсутствие ОО
Schuetze et al.	Дасатиниб	НМИК	II фаза	14	Отсутствие

[159]		против KIT, SRC	Рецидивные саркомы мягких тканей	MPNST (всего 200)	ОО
Dickson et al. [160]	Алисертиб	НМИК против AURKA	II фаза Саркомы мягких тканей высокой степени злокачествен- ности	10 MPNST (всего 72)	Отсутствие ОО
NCT01412892	Эверолимус	Ингибитор mTOR	II фаза НФИ с ПНФ	33	Отсутствие ОО
NCT01661283	Бевацизимаб	АТ против VEGF	II фаза Комбинация бевацизимаба и эверолимуса против MPNST	25	Текущее испытание
	Эверолимус	Ингибитор mTOR			
NCT01362803	Селуметиниб	НМИК против MEK	I/II фаза НФИ и неоперабельные ПНФ	30	Текущее испытание
NCT02407405	Селуметиниб	НМИК против MEK	II фаза неоперабельные ПНФ	-	Текущее испытание
NCT01275586	Нилотиниб	НМИК против KIT	0 фаза НФИ с ПНФ	6	Отсутствие ОО
NCT01402817	Сунитиниб	НМИК против VEGF, KIT	II фаза НФИ с ПНФ	19	Текущее испытание, набор участников остановлен из-за смерти пациента
NCT00427583	Иматиниб	НМИК против KIT	II/III фаза MPNST	11	Испытание остановлено Отсутствие ОО
NCT02008877	Ганетеспиб	Ингибитор HSP90	I/II фаза Комбинация ганетеспиба и сиролимуса против MPNST	38	Текущее испытание
	Сиролимус	Ингибитор mTOR			
NCT02096471	PD0325901	НМИК против MEK	II фаза Симптома- тические неоперабельные ПНФ	19	Текущее испытание

НМИК – низкомолекулярный ингибитор киназ,  
БПВ – беспрогрессивная выживаемость,  
ОВ – общая выживаемость,  
НФИ – нейрофиброматоз I типа,  
ПНФ – плексиформные нейрофибромы,  
ОО – ответ опухоли,  
АТ – антитела.



### 2.5.2. Ингибиторы Ras

Для доброкачественных и злокачественных опухолей оболочек периферических нервов, в клетках которых отсутствует функциональный нейрофибромин, терапевтической мишенью может служить активный, ГТФ-связанный Ras (Рис. 10). Фармакологическая регуляция белков Ras, однако, является чрезвычайно сложной задачей [161]. В качестве инструментов подавления активности Ras могут быть использованы ингибиторы пренилирования [161]. Пренилированием называют тип посттрансляционной модификации белков, при котором к белку присоединяется гидрофобная (пренильная) группа, необходимая для его заякорования на клеточной мембране и взаимодействия с другими белками. Ингибитор фарнезилтрансферазы, одного из ферментов, участвующих в пренилировании Ras, был испытан на плексиформных нейрофибромах у пациентов с нейрофиброматозом I типа [156] (Рис. 10). Вопреки ожиданиям, испытываемый препарат типифарниб не задерживал рост плексиформных нейрофибром [156] (Таблица 1). Предполагают, что неуспех этого испытания связан с тем фактом, что активация Ras, опосредованная потерей NF1 в нейрофибромах и MPNST, носит более сложный характер, чем в опухолях с активирующей мутацией в одной из изоформ Ras. Как обсуждалось в Главе 2.4.3., нейрофибромин регулирует активность всех ГТФаз Ras (N-Ras, K-Ras и H-Ras), в то время как типифарниб ингибирует только H-Ras. Опубликованные данные позволяют предположить, что внутри подсемейства Ras существует функциональная избыточность, и инактивация одной из изоформ приводит к увеличению продукции и активности двух других изоформ Ras [131]. Так как пренилирование N-Ras и K-Ras может осуществляться в отсутствие фарнезилтрансферазы, повышенная активность этих ГТФаз

может обеспечивать развитие опухолей оболочек периферических нервов под давлением типифарниба.

### 2.5.3. Ингибиторы каскадов MAPK/ERK и PI3K

К одной из альтернатив фармакотерапии Ras относится использование адресных препаратов, воздействующих на Ras-зависимые онкогенные сигнальные пути (Рис. 10). Киназный каскад MAPK/ERK (Raf>MEK>ERK), высокая активность которого характерна для плексиформный нейрофибром, а также спорадических и НФИ-ассоциированных MPNST, представляет собой очевидную мишень для терапии этих опухолей. Ингибиторы MEK были протестированы в ряде клеточных и мышечных моделях ПНФ и MPNST в качестве индивидуальных агентов и в сочетании с другими адресными препаратами [17-19]. В настоящий момент ингибиторы MEK селуметиниб и PD0325901 проходят испытания на плексиформных нейрофибромах у пациентов с НФИ (Таблица 1). В то же время, сейчас ведётся активный поиск новых комбинаций препаратов, включающих ингибиторы MEK, для терапии MPNST в доклинических исследованиях [162-164].

Ингибиторы узловых сигнальных молекул в составе другого Ras-зависимого киназного каскада, PI3K (PI3K>АКТ/ПКВ>mTOR), также являются потенциальными агентами терапии ПНФ и MPNST (Рис. 10). Большое количество экспериментальных данных показало аномальную активацию этого каскада в NF1-дефицитных клетках и эффективность ингибиторов mTOR в моделях MPNST *in vitro* и *in vivo* [10, 12, 20]. Монотерапия ингибитором mTOR эверолимусом оказалась неэффективна для лечения ПНФ (Таблица 1). Комбинации эверолимуса и его аналогов с другими адресными агентами в настоящее время проходят клинические испытания (Таблица 1).

#### **2.5.4. Ингибиторы каскада Wnt> $\beta$ -катенин**

Несколько недавних независимых исследований показали, что канонический сигнальный каскад Wnt (Wnt> $\beta$ -катенин) вовлечён в возникновение и развитие опухолей оболочек периферических нервов [6, 14-16]. Разработанные на сегодняшний день молекулярно-прицельные препараты, взаимодействующие с компонентами каскада Wnt> $\beta$ -катенин, отличаются высокой токсичностью и не имеют клинической значимости [165]. Тем не менее, в лабораторных исследованиях было предпринято несколько попыток ингибирования этого сигнального пути (Рис. 10). В частности, стабилизаторы белка AXIN1, компонента мультипротеинового комплекса, разрушающего  $\beta$ -катенин, XAV-939 и IWR-1, эффективно подавляли пролиферацию клеток MPNST [6].

#### **2.5.5. Нифедипин и кантаридин – потенциальные агенты для терапии MPNST**

В нашей лаборатории в поиске новых адресных агентов терапии НФИ-ассоциированных опухолей оболочек периферических нервов мы провели скрининг коллекции биологически-активных соединений, относящихся к различным классам лекарственных веществ [166]. В результате скрининга и первичной валидации его результатов были отобраны два препарата, обладающие избирательной токсичностью в отношении клеток, нокаутных по гену *Nf1*, - нифедипин и кантаридин.

Нифедипин относится к группе блокаторов потенциал-зависимых кальциевых каналов и широко используется в клинической практике в качестве антигипертензивного лекарственного средства [167].

Кантаридин представляет собой ингибитор протеинфосфатазы 2А (protein phosphatase 2A, PP2A) – фермента, играющего важную роль в

клеточной пролиферации, выживаемости и выборе пути дифференцировки [168].

В испытаниях на панели клеточных линий НФИ-ассоциированных MPNST кантаридин эффективно подавлял рост клеток MPNST (Таблица 2).

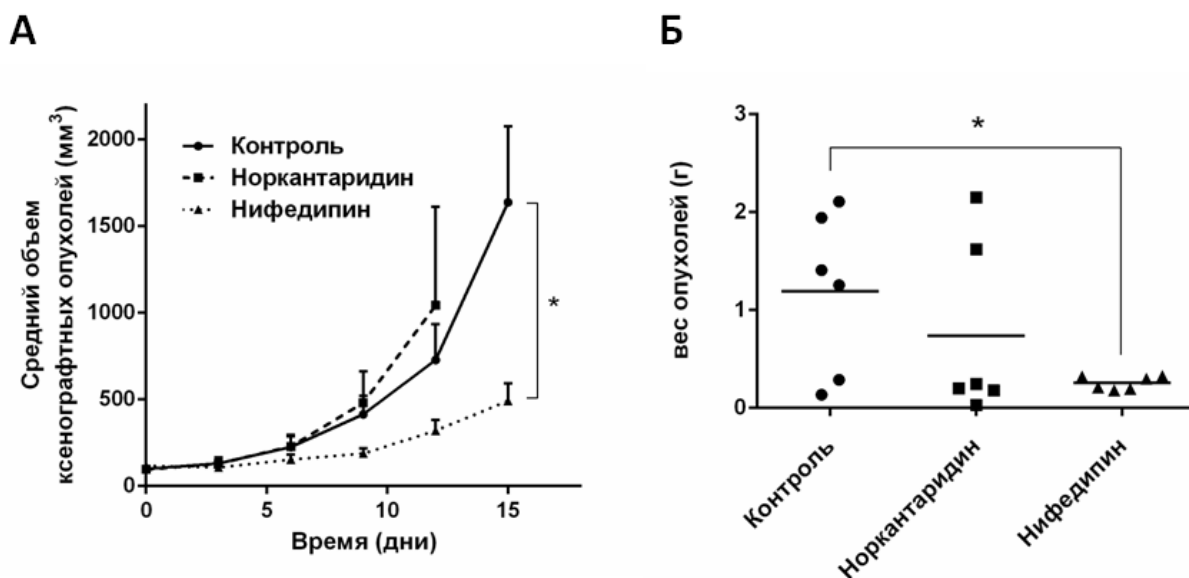
**Таблица 2. Чувствительность НФИ-ассоциированных линий MPNST к нифедипину и кантаридину.**

Линия MPNST	88-3	ST8814	90-8	S462TY	sNF96.2	sNF94.3	sNF02.2
Кантаридин EC <sub>50</sub> , мкМ	2.83 ± 0.32	3.38 ± 0.27	3.04 ± 0.17	4.25 ± 0.26	1.57 ± 0.13	0.92 ± 0.14	2.88 ± 0.22
Нифедипин EC <sub>50</sub> , мкМ	> 20	> 20	> 20	0.32 ± 0.03	> 20	> 20	> 20

EC<sub>50</sub> – полумаксимальная эффективная концентрация

В аналогичных экспериментах с использованием второго кандидатного ингибитора, нифедипина, шесть из семи исследуемых клеточных линий были резистентны к этому агенту. Тем не менее, нифедипин оказался весьма токсичным в отношении одной из линий MPNST (S462TY) в моделях *in vitro* (EC<sub>50</sub> = 0.32 мкМ) и *in vivo* (Рис. 11). В то же время, аналог кантаридина норкантаридин не показал статистически значимого эффекта на рост ксенографтов S462TY (Рис. 11).

Полученные данные указывают на существенную гетерогенность среди MPNST человека в экспрессии терапевтических мишеней и использовании механизмов лекарственной устойчивости. Дальнейшее изучение избирательной чувствительности MPNST, а также поиск универсальных мишеней для терапии этих опухолей являются актуальными задачами лабораторных исследований.



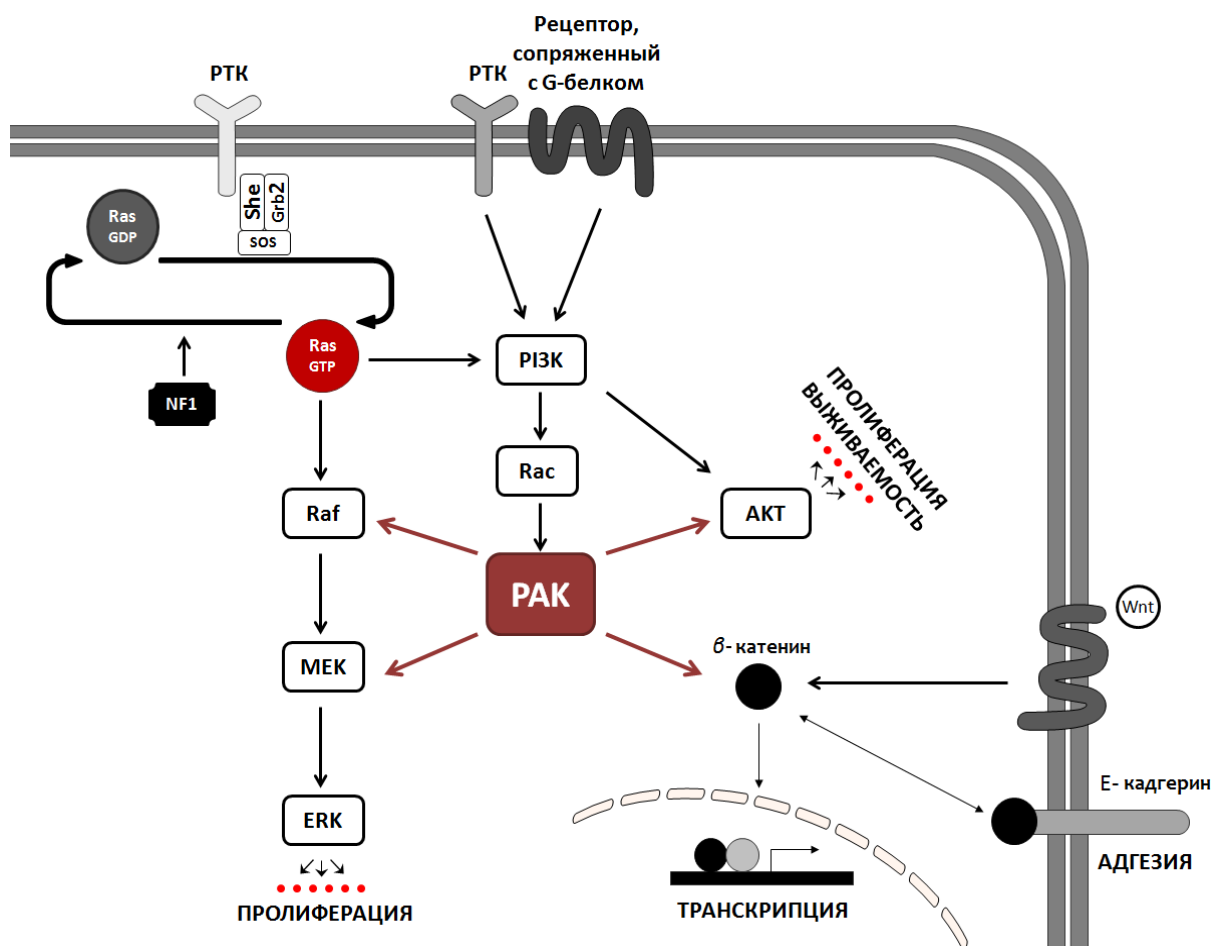
**Рисунок 11. Онкосупрессорный эффект нифедипина в модели подкожных ксенографтных MPNST, индуцированных клетками линии S462TY.**

## 2.6. Роль p21-активируемых киназ в патогенезе опухолей оболочек периферических нервов

На сегодняшний день мы располагаем ограниченной информацией о роли p21-активируемых киназ в развитии и распространении опухолей оболочек периферических нервов, однако, большой объём предварительных данных позволяет предположить, что сигнальный путь RAC>PAK1/2/3 является одним из ключевых в патогенезе ПНФ и MPNST (Рис. 12).

Известно, что активность RAC и PAK1 увеличена в некоторых типах клеток с пониженной дозой гена *Nf1*. Так, в тучных клетках мышей, гетерозиготных по *Nf1*, активность RAC2 (изоформа гемопоэтических клеток) и PAK1 значительно выше, чем у мышей дикого типа, и такие тучные клетки (*Nf1*+/-) обладают увеличенной пролиферативной и двигательной активностью [169]. Скрещивание *Nf1*-гаплонедостаточных

животных (*Nf1*<sup>+/-</sup>) с *PAK1*-нокаутными животными (*PAK1*<sup>-/-</sup>) приводит к частичному восстановлению дикого фенотипа тучных клеток [13]. Предполагают, что регуляция клеточного деления и хемотаксиса в этой модели осуществляется посредством сигнальных путей PI3K>RAC>PAK>MEK и PI3K>RAC>PAK>p38, соответственно [13]. Высокая активность RAC1 была также обнаружена в остеокластах *Nf1*-гетерозиготных мышей [170] и *Nf1*-нуллизоготных астроцитах [171]. Микроматричный анализ биоптатов НФИ-ассоциированных опухолей периферических нервов выявил увеличение копий гена *RAC1* в клетках MPNST по сравнению с клетками ПНФ и контрольными лимфоцитами [7].



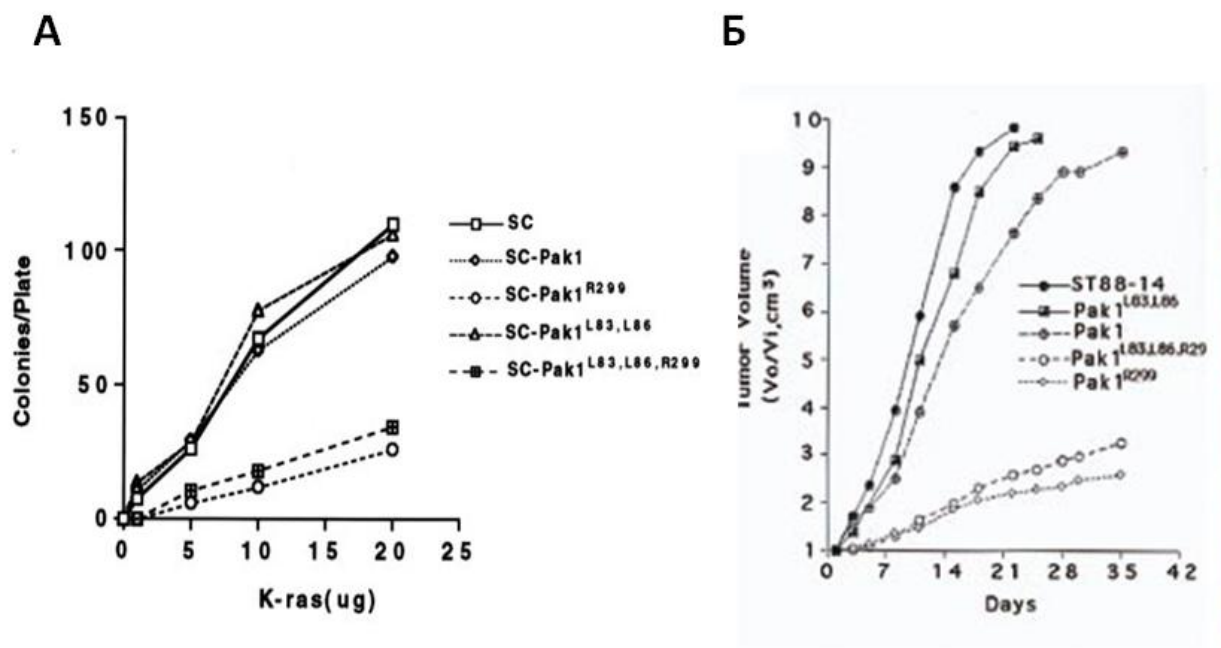
**Рисунок 12. Роль PAK1/2/3 в регуляции путей сигнальной трансдукции, вовлечённых в патогенез MPNST.**

Кроме этого, в MPNST была обнаружена амплификация других генов-звеньев RHO-зависимых сигнальных путей (*LIMK1*, *PTK2* и *ROCK2*). Повышенная экспрессия этих генов была подтверждена ОТ-ПЦР. В линиях НФИ-ассоциированных MPNST было также показано увеличение копий генов и мРНК *RAC1*, *ROCK2*, *LIMK1* и *PTK2* [7]. Хотя изменения копийности генов *PAK* не было отмечено в этом исследовании, логично предположить, что активность *PAK1/2/3* может повышаться в ответ на увеличение уровня *RAC1*.

Как обсуждалось в главе 2.2.1, в некоторых типах опухолей *PAK I* группы выполняют регуляторную функцию для таких важных сигнальных каскадов, как MAPK/ERK, PI3K>PKB/AKT и Wnt/ $\beta$ -катенин (Рис. 12). Так как возникновение и развитие MPNST зависит от функционирования этих сигнальных путей, использование *PAK1/2/3* в качестве терапевтических мишеней может дать дополнительные терапевтические опции для пациентов с MPNST.

К настоящему моменту была опубликована лишь одна работа, изучающая роль *PAK* в MPNST [21]. В этом исследовании иммортализованные шванновские клетки линии MT4N1 трансфицировали конструктами для экспрессии *PAK1* и *KRAS*. Индивидуальной интродукции активного мутанта *PAK1* (*PAK1*<sup>L83,L86</sup>) не оказалось достаточно для трансформации MT4N1. Интродукция *KRAS*, однако, вызывала злокачественную трансформацию MT4N1, которая была менее выраженной при добавлении доминантно-негативного *PAK1* (*PAK1*<sup>R299</sup>) (Рис. 13). Таким образом, можно сделать вывод, что активность *PAK* необходима для Ras-зависимой трансформации шванновских клеток.

При экспрессии мутантных *PAK1* в клетках MPNST человека линии ST8814 были получены аналогичные результаты. В последующих ксенографтных экспериментах доминантно-негативный *PAK1* подобным образом замедлял рост опухолей, индуцированных ST8814 (Рис. 13Б).



**Рисунок 13. Интродукция неактивного ПАК1 (ПАК1<sup>R299</sup>) подавляет RAS-зависимую трансформацию шванновских клеток и рост ксенографтов MPNST [21].**

А) Увеличение количества колоний шванновских клеток, интродуцированных KRAS совместно с ПАК1, ПАК1<sup>R299</sup>, ПАК1<sup>L83,L86</sup> и ПАК1<sup>L83,L86,R299</sup>

Б) Увеличение объёмов ксенографтных MPNST, индуцированных клетками ST8814, экспрессирующих ПАК1, ПАК1<sup>R299</sup>, ПАК1<sup>L83,L86</sup> и ПАК1<sup>L83,L86,R299</sup>

Эти данные позволяют предложить ПАК I группы в качестве потенциальных мишеней для терапии MPNST и служат предпосылкой настоящего исследования.



### 3. Материалы и методы исследования

Эксперименты на животных, а также исследование биопсийного материала, полученного от пациентов, проводили совместно с лабораторией молекулярной онкологии Онкологического центра «Фокс Чейз» (Филадельфия, США).

#### 3.1. Оборудование и материалы

**В работе использовали следующее оборудование:**

- CO<sub>2</sub>-инкубатор Forma Scientific Thermo Fisher Scientific, США
- pH-метр AB15 Thermo Fisher Scientific, США
- Автоматические пипетки Gilson, Франция
- Система для визуализации мембран ProteinSimple, США  
FluorChem E
- Система для визуализации малых Caliper Life Sciences, США  
лабораторных животных IVIS Spectrum
- Система газовой анестезии XGI-8 Caliper Life Sciences, США
- Весы аналитические PL601-S Mettler Toledo, США
- Вортекс Genie-2 VWR Scientific, США
- Ручная система автоматического подсчета Merck Millipore Ltd., США  
количества клеток Millipore Scepter
- Индукционная камера ветеринарной Caliper Life Sciences, США  
анестезии XIC-5 IVIS
- Камера для вертикального электрофореза Bio-Rad Laboratories, США
- Ламинарный шкаф SteriGuard Hood The Baker Company, США
- Матрасы для культивирования клеток Thermo Scientific, США
- Мембрана PVDF Merck Millipore Ltd., США

- Микроцентрифуга 110 VAC Fisher, США
- Оптический микроскоп NIKON Eclipse TE 2000U Nikon, США
- Планшетный спектрофотометр Envision Perkin Elmer, США
- Пластиковые пробирки на 1.5, 15 и 50 мл ThermoFisher Scientific, США
- Плашки BioCoat для инвазии в матригеле (размер пор ПЭТ мембраны 8.0 мкм) Corning, США
- Сканер для гистологических препаратов «Aperio ScanScope CS» Leica Microsystems Inc. (США)
- Стерильные туберкулиновые шприцы 1 мл BD Biosciences, США
- Стерильные иглы 25G и 30G BD Biosciences, США
- Термостат VWR Scientific, США
- Установка для содержания лабораторных животных Cage Mouse Vent Rack LABEX, США
- Центрифуга 5804 Eppendorf, Германия

**В работе использовали реактивы следующих фирм-производителей:**

Thermo Fisher Scientific, США: Трис-base, Трис-HCl, глицин, SDS (додецилсульфат натрия), метанол, глицерин, Tween-20, Тритон X-100, ЭДТА, борная кислота, бромфеноловый синий, ДТТ (дитиотриэтол), Среда Игла в модификации Дульбекко DMEM, среда OptiMEM, эмбриональная телячья сыворотка (ЭТС), стабильный димер глутамина GlutaMAX, пенициллин, стрептомицин, гигромицин Б, 0.05% раствор Трипсин – ЭДТА, набор для определения концентрации белка Pierce, индикатор жизнеспособности клеток AlamarBlue, трансфекционный реагент Lipofectamine 2000, трансфекционный реагент RNAiMAX, изофлуран, NaCl, NaF, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, NaN<sub>3</sub>, KCl, , KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.

SIGMA-ALDRICH, США:  $\beta$ -меркаптоэтанол, бычий сывороточный альбумин (БСА), диметилсульфоксид (ДМСО), Tween-80, формалин, форсколин, полибрен, краситель кристаллический фиолетовый, раствор йодида пропидия, полибрен, лимонная кислота, цитрат натрия, 2-гидроксипропил- $\beta$ -циклодекстрин (HP- $\beta$ -CD), гипромеллоза, гематоксилин и эозин для гистологических срезов

**Также использовали:**

Маркер молекулярного веса белков PageRuler Plus (Fermentas, Литва), протеиназа К, ингибиторы протеаз cOmplete, ингибиторы фосфотаз PhosSTOP (Roche, Германия), хемилюминесцентный субстрат Immobilon Western (Millipore, США), миРНК к *PAK1*, *PAK2* и *PAK3*, контрольная миРНК (Dharmacon, США), субстрат билюминесцентной реакции RediJect D-Luciferin Ultra (Perkin Elmer, США), Градиентные (4-20%) полиакриламидные гели для электрофореза в трис-глициновом буфере, краситель Ponceau S, 0,4% раствор красителя трипанового синего (Bio-Rad, США), матригель с пониженным содержанием ростовых факторов (BD Biosciences, США), хромогенный субстрат «Liquid DAB + Substrate Chromogen System» (Dako, США), блокирующий раствор Background Sniper, блокирующий раствор Da Vinci Green antibody diluent (Biocare Medical, США)

**В работе использовали следующие антитела:**

Первичные антитела против *PAK1*, *PAK2*, *PAK3*, *PAK1/2/3*, фосфо-МЕК1 [S298], фосфо-МЕК1/2 [S217/221], МЕК1/2, фосфо-ERK1/2 [T202/Y204], ERK1/2, фосфо-АКТ [S473], АКТ, фосфо-mTOR [T2448], mTOR, активного  $\beta$ -катенина, N-кадгерина,  $\beta$ -актина, фосфо-гистона H3 [S10], расщеплённой каспазы 3 (Cell Signaling Technologies, США), E-кадгерина,  $\beta$ -катенина (BD Biosciences, США), фосфо-*PAK1/2/3* [S144/S141/S139], GPDH (Abcam, США), *RAC1* (Millipore, США).

Вторичные меченные пероксидазой хрена козы антитела против мышинных и кроличьих иммуноглобулинов (Jackson immunoresearch, США).

### **3.2. Буферные растворы**

**PBS (Фосфатно-солевой буфер, pH 7.4):** 137 мМ NaCl, 2.7 мМ KCl, 10 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.8 мМ KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>;

**Трис-глициновый буфер (буфер для электрофореза в ПААГ):** 25 мМ Трис-base, 250 мМ Глицин, 0.1% SDS;

**Буфер для переноса:** 25 мМ Трис-base, 192 мМ Глицин, 20% метанол

**Трис-буфер TBS:** 50 мМ Трис-HCl (pH 7.6), 50 мМ NaCl

**Буфер TBS-T:** TBS, 0.1% Tween-20;

**Буфер RIPA (буфер для получения клеточных лизатов):** 1% Triton-X100, 10% глицерин, 50мМ HEPES, pH 7,4, 150мМ NaCl, 1,5мМ MgCl<sub>2</sub>, 1мМ EGTA, 1мМ EDTA, 0,1% SDS, 10мМ фенилметилсульфонил-фторид;

**Буфер PBS-TDS (буфер для получения тканевых лизатов):** 1% Triton X-100, 0.5% дезоксихолат натрия, 0.1% SDS, 1 мМ EDTA в растворе PBS;

**Шестикратный SDS-буфер для нанесения белков на гель:** 150мМ Трис-HCl (pH 6,8), 3%SDS, 300мМ ДТТ (дитиотреитол), 30% глицерин, 0.3% бромфеноловый синий;

**Цитратный буфер (pH 3.0):** 50 мМ лимонная кислота, 50мМ цитрат натрия.

**Формалин нейтральный забуференный:** 4% формальдегид, PBS (pH 7.0).

### **3.3. Линии эукариотических клеток**

Клетки злокачественных опухолей оболочек периферических нервов (malignant peripheral nerve sheath tumors, MPNST) человека линий sNF96.2, sNF02.2 и sNF94.3 были получены из Американского банка клеток и тканей (ATCC, кат. №№ CRL-2884, CRL-2885 и CRL-2886), STS26T,

S462TY ST8814, ST88-3 и 90-8 были любезно предоставлены доктором Н. Рэтнер (Детский госпиталь Цинциннати, США).

Иммортализованные шванновские клетки человека (immortalized human Schwann cells, iHSC) были любезно предоставлены доктором А. Хоук (Университет Джонса Хопкинса, США).

Пакующие клетки НЕК293 линии Phoenix Ampho получены из ATCC (кат. № CRL-3213).

### **3.4. Лабораторные животные**

Иммунодефицитные мыши линий Nude (CrTac:NCr-*Foxn1*<sup>nu</sup>) и SCID (C.B-*Igh-1*<sup>b</sup>/CrTac-*Prkdc*<sup>scid</sup>) были получены из компании Taconic Farms, США.

Мыши содержались в стерильных условиях, свободных от патогенов в Питомнике Онкологического центра «Фокс Чейз», США, одобренном комитетом по содержанию и использованию лабораторных животных (Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC).

### **3.5. Тканевые микроматрицы**

Тканевые микроматрицы (tissue microarrays, TMA), содержащие образцы тканей злокачественных опухолей оболочек периферических нервов – MPNST (n=207), нейрофибром (n=56) и нормальных нервов человека (n=11), были любезно предоставлены профессором А. Лазар (Онкологический центр имени М. Д. Андерсона, США). Образцы, использованные для создания TMA, были получены в ходе хирургических резекций в Онкологическом центре имени М. Д. Андерсона. При этом ткань из одной опухоли помещалась на два уникальных участка на TMA. Пациенты-доноры дали свое согласие на забор и анонимное хранение образцов опухоли.

## **3.6. Методы**

### **3.6.1. Культивирование клеточных линий**

Все клеточные линии, кроме iHSC, культивировали в среде DMEM с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС), 2мМ L-глутамина, 50 мкг/мл пенициллина, 50 мкг/мл стрептомицина при 37<sup>0</sup> С, 85% влажности, 5% CO<sub>2</sub>. iHSC выращивали в полной среде с добавлением 2 мкМ форсколина. Все клеточные линии вели не более 30 пассажей.

Клеточные линии были тестированы на наличие микоплазмы и показали отсутствие контаминации. Тестирование проводилось в отделении Клеточных культур онкологического центра «Фокс Чейз» (Филадельфия, США).

### **3.6.2. Приготовление белковых лизатов**

Для получения клеточных или тканевых лизатов клетки обрабатывали буфером RIPA или TBS-TDS, соответственно, с добавлением ингибиторов протеаз и фосфатаз (Roche). После инкубации клеток и тканей в лизирующем буфере в течение 15 на льду, лизаты центрифугировали при 12000 g в течение 10 мин при +4<sup>0</sup>С. В отобранных супернатантах измеряли концентрацию белка методом Лоури.

### **3.6.3. Иммуноблоттинг**

Разделение белков проводили по методу Лэммли в денатурирующих условиях. Клеточные и тканевые лизаты перед нанесением кипятили в SDS-буфере в течение 10 мин для полной денатурации белков. Электрофорез проводили в градиентном (4-12%) ПААГ при напряжении 120В. В качестве белков-стандартов использовали окрашенный маркер (Fermentas). После разделения белки переносили на поливинилиденфторидную (PVDF) мембрану методом электроблоттинга

при напряжении 30В в течение 4-10 ч. Контроль переноса белков осуществляли красителем Ponceau S (Bio-Rad).

Иммунодетекцию белков проводили следующим образом. Мембрану с белками инкубировали в течение 1 ч в блокирующем буфере - 3% растворе БСА на основе TBS-T. После этого мембрану инкубировали с первичными антителами в конечной концентрации 100 нг/мл в течение 12-24 ч при 4°C в блокирующем буфере. Затем мембрану трижды отмывали в буфере TBS-T и инкубировали со вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена, в блокирующем буфере в течение 1 ч при комнатной температуре. Повторяли процедуру отмывки и затем проводили визуализацию. Для детекции сигнала мембрану обрабатывали субстратом пероксидазы хрена Immobilon Western (Millipore). Белки визуализировали на приборе FluorChem E System (ProteinSimple) и обрабатывали с помощью программы ImageJ.

#### **3.6.4. Ретровирусная трансдукция**

Для получения клеток злокачественных оболочек периферических нервов (MPNST), а также иммортализованных шванновских клеток человека (iHSC), стабильно продуцирующих пептидный ингибитор PAK1/2/3 GST-PID, использовали экспрессионный вектор pBMN-GST-PID, ранее полученный в лаборатории Дж. Чернофф [172] на основе вектора pBMN-I-GFP. Пакующие клетки Phoenix Ampro трансфицировали вектором pBMN--GST-PID (или контрольным вектором pBMN-I-GFP) при помощи реагента Lipofectamine 2000 согласно рекомендациям производителя. Через 24 ч после постановки трансфекции производили замену трансфекционной среды. Супернатант, содержащий ретровирусные частицы, собирали в течение последующих двух суток и профильтровывали. Клетки MPNST и iHSC инкубировали с полученным супернатантом с добавлением 4 мг/мл полибрена в течение 24 ч, после

чего культивировали в полной ростовой среде в течение 48 ч для интеграции вирусных частиц. Клетки, продуцирующие зелёный флуоресцентный белок (green fluorescent protein, GFP) отбирали цитофлуориметрически.

Для получения клеток STS26T-Luc, стабильно экспрессирующих ген люциферазы светляка (*Luc*) клетки MPNST линии STS26T трансдуцировали экспрессионным вектором pWZL-Luc, любезно предоставленным доктором Мёрфи (Институт Вистар, США), как описано выше, после чего проводили селекцию клеток в среде, содержащей 100 мкг/мл гигромицина В.

### **3.6.5. Трансфекция малой интерферирующей РНК**

Трансфекция клеток малой интерферирующей РНК (миРНК) проводили при помощи трансфекционного реагента RNAiMAX (Thermo fisher Scientific) в соответствии с инструкцией производителя. Вкратце, на одну лунку 6-луночного планшета отдельно готовили раствор 4 мкл миРНК (10 мкМ) и раствор 9 мкл трансфекционного реагента RNAiMAX – каждый в 150 мкл бессывороточной среды OptiMEM. Полученные растворы объединяли и инкубировали 5 минут при комнатной температуре для образования комплексов миРНК-RNAiMAX. Далее к комплексу добавляли  $10^6$  клеток, ресуспендированных в 900 мкл полной среды, так, что конечная концентрация миРНК в полученной смеси составляла 25 нМ. Через 48 ч после трансфекции происходил полный нокдаун целевого гена в трансфицированных клетках.

### **3.6.6. Построение кривых роста**

Для построения кривых роста  $2 \cdot 10^4$  клеток в полной ростовой среде высевали на 24-луночные плашки. В течение 5 последующие дней каждые



24 ч клетки трипсинизировали, добавляли краситель трипановый синий, и подсчитывали количество живых клеток при помощи цитометра (Millipore).

### **3.6.7. Анализ жизнеспособности клеток *in vitro***

Анализ жизнеспособности клеток проводили с помощью реагента alamarBlue в соответствии с инструкцией производителя. Вкратце, клетки сажали на 96-луночные планшеты в концентрации 5 тысяч клеток на лунку в 90 мкл полной среды. Через 24 ч добавляли лекарственные препараты в 10 мкл среды в 10-кратном разведении. DMSO использовали в качестве отрицательного контроля. Клетки инкубировали с препаратами в течение 72 ч, после чего в лунки добавляли реагент alamarBlue в объёме 10 мкл на лунку. Через 3 ч после добавления реагента при помощи флуоресцентного спектрофотометра измеряли флуоресценцию клеток с длиной волны поглощения 530-560 нм и испускания 590 нм.

### **3.6.8. Анализ клеточной инвазии**

Для определения инвазивной способности клеток MPNST и iHSC использовали модифицированные камеры Бойдена с диаметром пор фильтра 8 мкм, покрытые матригелем (плашки BioCoat, Corning). Для контролей использовали лунки без матригеля.

В верхние лунки 24-луночных камер высевали клетки ( $10^5$  клеток STS26T,  $5 \times 10^5$  клеток ST8814, S462TY или iHSC), ресуспендированные в бессывороточной среде DMEM. В нижние камеры помещали среду DMEM, содержащую 10% ЭТС. Клетки инкубировали в течение 18 ч, после чего фиксировали 4% раствором формальдегида и визуализировали красителем кристаллическим фиолетовым. Не мигрировавшие клетки убирали с внутренней стороны камеры ватным тампоном. С помощью

оптического микроскопа при десятикратном увеличении в случайном порядке фотографировали шесть полей с каждой лунки и подсчитывали количество окрашенных клеток. Долю инвадировавших клеток рассчитывали как отношение клеток, мигрировавших через мембрану в лунках с матригелем к таковому в лунках без матригеля.

### **3.6.9. Исследование противоопухолевой активности Fgrax1036 и PD0325901 в модели подкожных ксенографтных MPNST**

Все эксперименты *in vivo* проводили в соответствии со стандартными протоколами, одобренными IACUC в Онкологическом центре «Фокс Чейз» (Филадельфия, США).

Ксенографты с использованием клеток злокачественных опухолей оболочек периферических нервов (MPNST) прививали самкам бестимусных мышей Nude в возрасте 4-6 недель (n=6). Каждой мышке подкожно вводили  $10^6$  клеток линии STS26T или  $10^7$  клеток линии S462TY в 100 мкл 30% раствора матригеля (BD Biosciences) на основе PBS. Терапию начинали, когда средний объём опухоли достигал  $\sim 100$  мм<sup>3</sup>. Fgrax1036 разводили в 20% растворе HP-b-CD на основе 50 мМ цитратного буфера (pH 3.0) и вводили в дозе 30 мг/кг/день. PD0325901 приготавливали в виде суспензии в водном растворе 0.5% гипромеллозы и 0.2% Tween-80 и вводили ежедневно в дозе 5 мг/кг или 10 мг/кг. Препараты вводили *per os*, при помощи желудочного зонда. Контрольные животные получали растворитель. Каждые три дня мышей наблюдали, взвешивали, измеряли опухоли при помощи штангенциркуля. Объём опухоли определяли по двум параметрам и рассчитывали по формуле  $V=L*W^2*(\pi/6)$ , где  $V$  – объём опухоли в мм<sup>3</sup>,  $L$  – продольный диаметр опухоли в мм,  $W$  – поперечный диаметр опухоли в мм.

При достижении опухолью объёма 2000 мм<sup>3</sup> мышей усыпляли с помощью CO<sub>2</sub>, и собирали опухоли. Каждую опухоль взвешивали и (если

позволяли размеры опухоли) разделяли на две части, одна из которых была немедленно заморожена в жидком азоте для дальнейшего приготовления белковых лизатов (Глава 3.6.2.), другая была фиксирована в формалине для иммуногистохимического анализа (Глава 3.6.12.).

### **3.6.10. Исследование противоопухолевой активности Frax1036 и PD0325901 в модели экспериментальных лёгочных метастазов MPNST**

Для инициирования экспериментальных лёгочных метастазов клетки злокачественных опухолей оболочек периферических нервов линии STS26T, меченные люциферазой ( $10^6$  клеток в 100 мкл PBS), вводили в хвостовую вену самкам иммунодефицитных мышей SCID в возрасте 4-8 недель (n=7). Терапию начинали в день инъекции. Растворы Frax1036 и PD0325901 готовили, как описано в Главе 3.6.10., в дозах 30мг/кг/день и 5 мг/кг/день, соответственно, и вводили мышам при помощи желудочного зонда. Мониторинг роста и распространения опухолевых клеток STS26T-Luc проводили раз в неделю при помощи неинвазивной биолуминесцентной визуализации (bioluminescent imaging, BLI). По окончании эксперимента мышей усыпляли углекислым газом, лёгкие выделяли, взвешивали и фиксировали в формалине для дальнейшего гистологического исследования.

### **3.6.11. Биолуминесцентная визуализация метастазов**

Непосредственно перед визуализацией лёгочных метастазов мышей погружали в наркоз в индукционной камере в атмосфере 3% изофлурана и кислорода. Все последующие этапы процедуры мыши находились под наркозом. За 10 минут до визуализации на приборе IVIS Spectrum (Caliper Life Sciences) мышам вводили раствор субстрата RediJect D-Luciferin Ultra

(Perkin Elmer) внутрибрюшинно в дозе 150 мг/кг. Визуализацию проводили согласно описанному протоколу [173]. Анализ изображений и количественную оценку суммарного потока излучения в исследуемой области (энергетическая яркость  $Le$ ) проводили, используя программное обеспечение Living Image для системы IVIS Spectrum. Для количественной оценки биолюминесценции идентичные круглые области выделяли вокруг грудной клетки каждой мыши. Выделенные области сохраняли постоянными по площади и положению для всех животных.

### **3.6.12. Подготовка образцов тканей для гистологических исследований**

Образцы тканей легких и опухолей фиксировали в нейтральном забуференном 10% формалине в течение 24 - 48 ч, затем дегидратировали. Дегидратирование тканей проводили, обрабатывая образцы растворами этанола и ксилола (70% этанол - 3 ч, 95% этанол - 2 ч, 100% этанол - 2 ч, этанол-ксилол - 2 ч, ксилол - 3 ч), после чего ткани погружали в парафин.

При помощи микротомы приготавливали срезы парафиновых блоков толщиной 5 мкм и монтировали на предметные стёкла. Депарафинизацию проводили при помощи ксилола и спиртов различной концентрации: ксилол – 5 мин, 2 раза; этанол 100%, 5 мин, 2 раза; этанол 96%, 5 мин, 2 раза; этанол 70%, 3 мин, 1 раз; этанол 30%, 3 мин, 1 раз. Затем образцы промывали водой и помещали в буфер TBS. Далее слайды окрашивали гематоксилином и эозином или иммуногистохимически.

### **3.6.13. Иммуногистохимическое исследование**

Проведение иммунохимического окрашивания тканевых микроматриц (ТМА) было одобрено Экспертным советом организации.

ТМА окрашивали антителами к фосфо-PAK1/2/3 [S144/S141/S139] (Abcam). Срезы ксенографтных опухолей окрашивали антителами к фосфо-гистону H3 [S10] для анализа клеточной пролиферации; а также антителами к расщеплённой каспазе 3 (Cell Signaling, США) для оценки уровня апоптотической активности. Для окрашивания использовался стандартный протокол. Образцы блокировали раствором Background Sniper (Biocare Medical) в течение 20 минут. Демаскирование антигенов выполняли в цитратном буфере, pH 6 (Dako) в течение 20 мин при 99°C. Эндогенные пероксидазы гасили 3% раствором перекиси водорода в метаноле в течение 10 минут. Стёкла инкубировали с первичными антителами в растворе Da Vinci Green antibody diluent (Biocare Medical). Связывание первичных антител усиливали с помощью набора «VECTASTATIN Elite ABC Kit» (Vector Laboratories, Inc, США), включающий биотинилированные противокроличьи вторичные антитела. Связывание антител визуализировали с использованием DAB-хромогенного субстрата (Dako). Образцы были контрокрашены гематоксилином в течение 1 минуты.

Иммуногистохимически окрашенные срезы сканировали с помощью сканера «Аперо» (Aperio ScanScope CS) и системы «Вектра» (Vectra Automated Quantitative Pathology Imaging System, Perkin Elmer, США). Избранные участки обводили вручную при консультировании патолога. Процент клеток, окрашенных антителами к фосфо-гистону H3 [S10] и расщеплённой каспазе 3 был оценен с использованием специальных протоколов и алгоритмов системы «Вектра». Расчет гистологического индекса H-score производили по следующему алгоритму: было вычислено процентное содержание клеток при каждом уровне интенсивности окрашивания; H-score был присвоен в автоматическом режиме каждому уровню интенсивности окрашивания по формуле:  $[1 \times (\% \text{ клеток } 1^+) + 2 \times (\% \text{ клеток } 2^+) + 3 \times (\% \text{ клеток } 3^+)]$  [174].

### **3.6.14. Построение кривых доза/эффект, расчёт полумаксимальной эффективной концентрации (IC<sub>50</sub>) и комбинационного индекса (CI)**

Влияние низкомолекулярных ингибиторов PAK1/2/3(Frax1036) и MEK1/2 (PD0325901) на жизнеспособность клеток MPNST и iHSC *in vitro* оценивали, как описано в Главе 3.6.7. Для построения кривых доза/эффект использовали двойные последовательные разведения препаратов. При тестировании комбинаций двух препаратов использовали фиксированные соотношения их концентраций. Для каждой клеточной линии среднее количество жизнеспособных клеток в контрольных лунках принимали за 1, остальные значения нормализовали к отрицательному контролю. Характер взаимодействия препаратов определяли, используя принцип медианного эффекта Chou и Talalay [175]. Аппроксимацию эмпирических данных, расчёт концентрации полумаксимального ингибирования (half maximal inhibitory concentration, IC<sub>50</sub> - концентрации вещества, при которой доля жизнеспособных клеток составляет 50%), а также определение комбинационного индекса (combination index, CI) осуществляли при помощи программы CalcuSyn (Biosoft). Взаимодействие препаратов считали синергическим при значении CI<1; аддитивным при CI=1 и антагонистическим при CI>1.

### **3.6.15. Статистическая обработка данных**

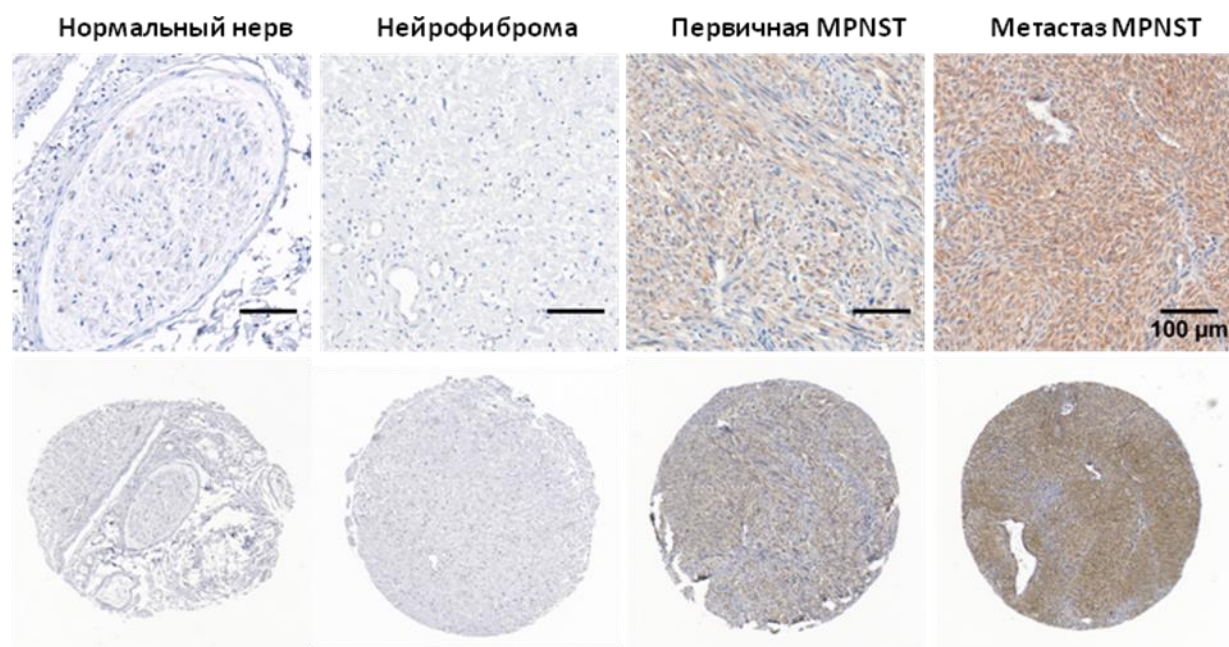
Достоверность отличий оценивали с помощью парного t-критерия Стьюдента с коррекцией по Уэлчу во всех экспериментах *in vitro*. Для экспериментов с использованием ксенографтной модели и модели лёгочных метастазов проводили попарное сравнение в исследуемых группах с помощью критерия Манна-Уитни. Статистическая значимость (двусторонний критерий) была установлена на уровне P < .05.

## 4. Результаты и обсуждение

### 4.1. Оценка активности РАК1/2/3 в злокачественных опухолях оболочек периферических нервов человека

#### 4.1.1. Измерение уровня фосфо-РАК1/2/3 [S144/S141/S139] в биоптатах MPNST человека

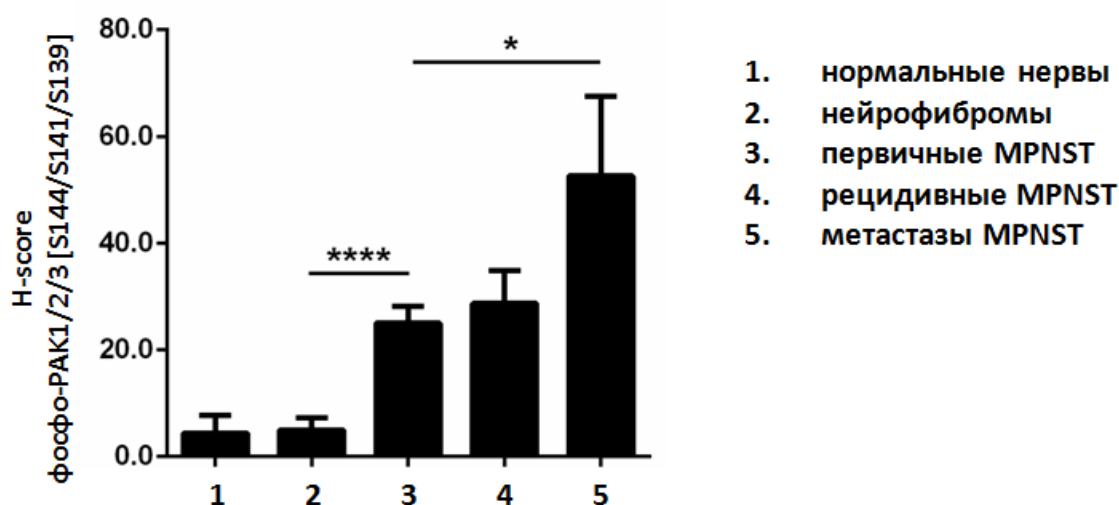
Для того чтобы оценить возможный вклад протеинкиназ подсемейства РАК в патогенез нейрофибром и MPNST, в серии образцов тканей опухолей оболочек периферических нервов человека определяли активность р21-активируемых киназ I группы. В качестве показателя каталитической активности РАК1/2/3 использовали интенсивность фосфорилирования РАК1/2/3 по остаткам серина [S144/S141/S139] [176]. Тканевые микроматрицы (tissue microarray, TMA), содержащие клинически охарактеризованные биообразцы, полученные из нормальных



**Рисунок 14. Репрезентативные фотографии образцов тканевых микроматриц (ТМА), иммуногистохимически окрашенных антителами к фосфо-РАК1/2/3 [S144/S141/S139].**

периферических нервов человека, доброкачественных опухолей оболочек периферических нервов (нейрофибром), первичных MPNST, рецидивных MPNST, а также метастазов MPNST, были иммуногистохимически окрашены на фосфо-РАК1/2/3 [S144/S141/S139]. (Рис. 14).

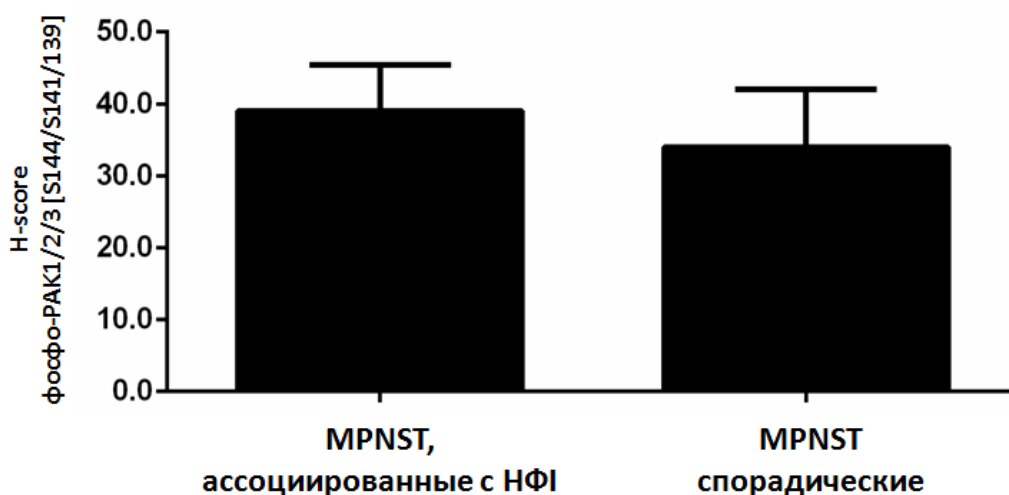
Между интенсивностью фосфорилирования РАК в тканях доброкачественных опухолей (нейрофибром) и тканях нормальных нервов не было обнаружено статистически значимой разницы, однако, уровень фосфо-РАК1/2/3 был существенно увеличен в образцах MPNST (Рис. 15). Кроме этого, метастатические MPNST показали значительно более высокий уровень фосфорилирования РАК1/2/3 по сравнению с первичными MPNST (Рис. 15).



**Рисунок 15.** Анализ интенсивности иммуногистохимического окрашивания тканевых микроматриц, содержащих образцы опухолей оболочек периферических нервов человека, на фосфо-РАК1/2/3 [S144/S141/S139]. Данные представлены в виде среднего значения и стандартного отклонения (\*=  $p < 0.05$ , \*\*\*\*=  $p < 0.0001$ ).



Анализ биообразцов первичных MPNST в соответствии с наличием герминативной мутации в гене нейрофибромина (*NF1*) у пациентов-доноров не выявил взаимосвязи между уровнем фосфо-РАК1/2/3 и нейрофиброматозом I типа (НФИ) в анамнезе (Рис. 16).



**Рисунок 16. Анализ интенсивности иммуногистохимического окрашивания образцов спорадических (спонтанных) MPNST и MPNST у пациентов с НФИ на фосфо-РАК1/2/3 [S144/S141/S139].**

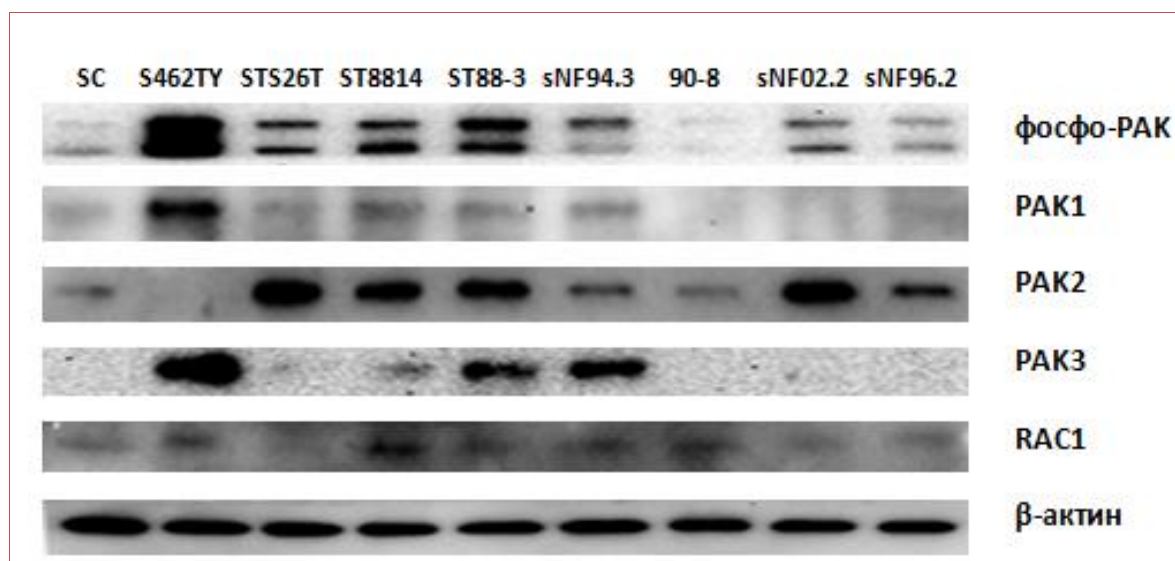
Данные представлены в виде среднего значения и стандартного отклонения.

Полученные данные иммуногистохимического окрашивания позволяют предположить, что белки РАК I группы являются важными звеньями патогенеза опухолей оболочек периферических нервов высокой степени злокачественности и могут играть ключевую роль в распространении этих опухолей. Очевидно, утрата нейрофибромина клетками ПНФ не является достаточным условием для активации РАК1/2/3. Это может означать, что в клетках злокачественных опухолей оболочек периферических нервов в регуляции активности каскада  $RAC1 > PAK1/2/3$  участвуют Ras-независимые сигнальные пути.

#### 4.1.2. Измерение уровней белков и фосфо-белков PAK1/2/3 в клеточных линиях MPNST

Для последующих доклинических испытаний была собрана панель из семи клеточных линий НФИ-ассоциированных MPNST человека: S462TY, ST8814, sNF02.2, sNF96.2, sNF94.3, 90-8 и 88-3, а также клеток спорадической MPNST человека STS26T.

Для того чтобы определить, характерна ли для испытываемых линий MPNST повышенная активность PAK, аналогичная наблюдаемой в опухолевых биоптатах, клеточные лизаты были проанализированы методом вестерн-блот. В качестве контроля использовали лизат первичных шванновских клеток человека (SC). Уровни экспрессии индивидуальных членов подсемейства PAK (PAK1, PAK2 и PAK3) различались в клеточных линиях MPNST (Рис. 17).



**Рисунок 17. Вестерн-блот анализ уровня PAK1, PAK2, PAK3, фосфо-PAK1/2/3 и RAC1 в шванновских клетках (SC) и клетках MPNST человека.**

В 7 из 8 линий MPNST был выявлен повышенный уровень фосфорилирования PAK1/2/3 по сравнению с таковым в нормальных

шванновских клетках человека. В линии ST8814, для которой было ранее показано увеличение копий гена и РНК *RAC1* [7], выявлено увеличение его белкового продукта (Рис. 17).

Таким образом, была показана активация сигнальной трансдукции, опосредованной PAK1/2/3 в клеточных линиях MPNST человека. Для дальнейших экспериментов *in vitro* были выбраны три клеточные линии с различными свойствами: S462TY – линия НФИ-ассоциированной MPNST с высоким уровнем фосфо-PAK1/2/3, STS26T – линия спорадической MPNST с уровнем фосфо-PAK1/2/3, сравнимым с уровнем в нормальных шванновских клетках, и ST8814 – линия НФИ-ассоциированной MPNST, демонстрирующая повышенный уровень RAC1 и умеренное увеличение активности PAK1/2/3.

## **4.2. Изучение роли PAK1/2/3 в регуляции пролиферативной и двигательной активности клеток MPNST**

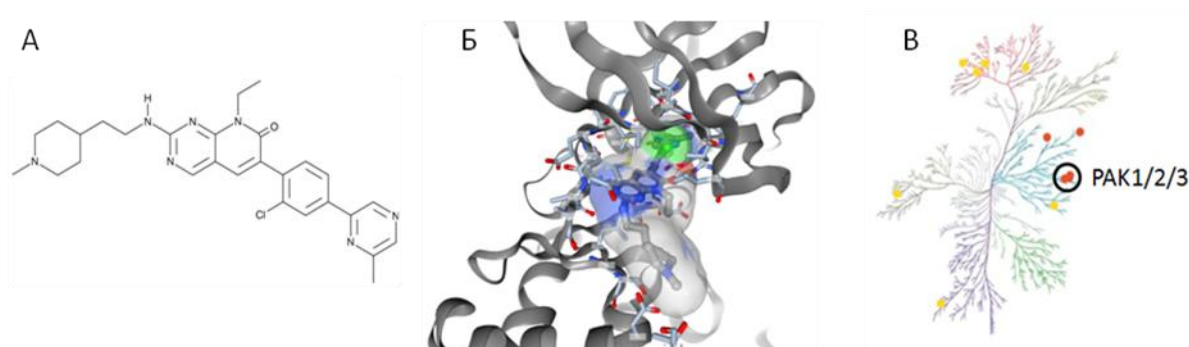
### **4.2.1. Ингибирование каталитической активности PAK1/2/3**

Согласно литературным данным, ранее только в одной работе была исследована возможность использования PAK в качестве мишени для терапии MPNST [21]. В этой работе для подавления активности PAK в клетках MPNST линии ST8814 экспрессировали доминантно-негативную форму PAK1. Такой подход имеет ряд ограничений, связанных с возможными неканоническими эффектами больших количеств рекомбинантного белка.

В нашей работе для оценки функциональной значимости активации PAK в клетках MPNST были использованы ингибиторы двух разных групп: низкомолекулярный ингибитор PAK1/2/3 Frax1036 (Рис. 18) и пептидный ингибитор GST-PID.

GST-PID представляет собой полипептид, аминокислотная последовательность которого соответствует автоингибиторному домену PAK2 (PAK inhibitory domain, PID), меченный глутатионтрансферазой (glutathione-S-transferase, GST) [172]. Продукция GST-PID эукариотическими клетками обеспечивает связывание PID с каталитическим доменом эндогенных PAK1/2/3 и последующее ингибирование киназной активности этих белков.

Frax1036 - АТФ-конкурентный киназный ингибитор ряда пиридопиримидинов (Рис. 5А, Б), высокоспецифичный в отношении р21-активируемых киназ I группы (Рис. 18В). Frax1036 был ранее испытан в ряде доклинических исследований и продемонстрировал статистически значимый антипролиферативный эффект в отношении клеток опухолей мозга, яичников и молочной железы *in vitro* и *in vivo* [95, 98, 177].



**Рисунок 18. АТФ-конкурентный ингибитор PAK Frax1036.**

А) Строение Frax1036

Б) Кристаллическая структура комплекса PAK1 с молекулой Frax1036 (PDB ID: 5DFP)

В) Селективность Frax1036. Киназы-мишени Frax1036 обозначены кружками на «киномном дереве» [95].

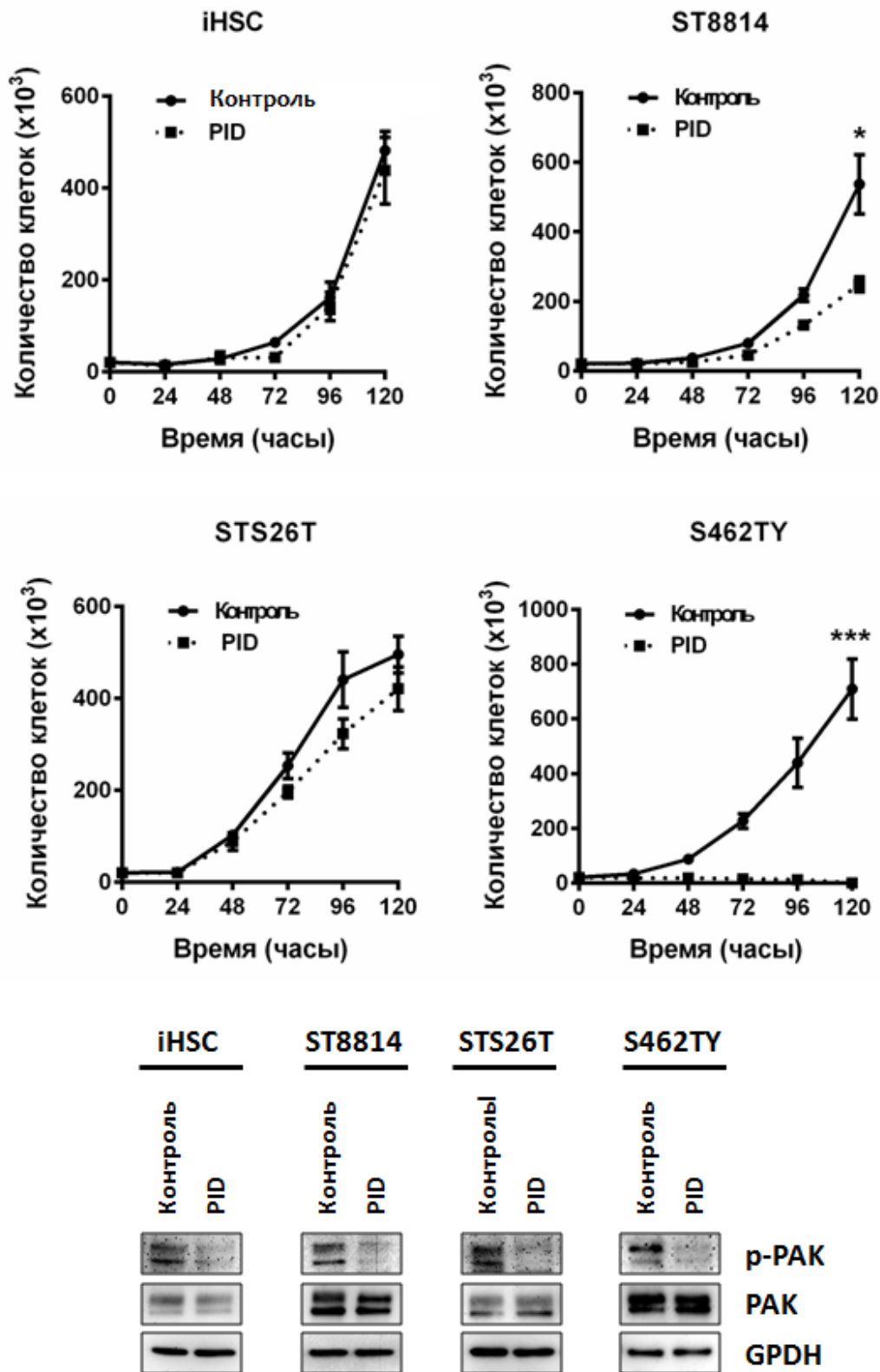
Применение двух селективных ингибиторов с различными механизмами действия позволяет отличать эффекты, связанные с ингибированием PAK1/2/3, от нецелевых эффектов Frax1036 и GST-PID в клеточных моделях MPNST. Для двух ингибиторов использовали два

соответствующих контроля. Клетки, трансдуцированные рBMN-GST-PID, сравнивали с клетками, трансдуцированными «пустым» вектором рBMN-I-GFP. Для Frax1036 в моделях *in vitro* в качестве контроля использовали растворитель DMSO.

#### **4.2.2. Влияние выключения PAK1/2/3 на рост и выживаемость клеток MPNST**

Для того чтобы оценить зависимость клеточной пролиферации MPNST от внутриклеточной сигнализации, опосредованной PAK1/2/3, клетки трёх линий MPNST (S462TY, STS26T, ST8814), а также нормальные иммортализованные шванновские клетки человека (iHSC) инфицировали ретровирусом, кодирующим ингибитор PAK GST-PID, и строили кривые роста (Рис. 19).

Было показано, что экспрессия *GST-PID* ингибирует фосфорилирование PAK1/2/3 во всех испытываемых клеточных линиях (Рис. 19). GST-PID вызывал гибель клеток S462TY и снижал скорость роста клеток ST8814, оказывая, однако, незначительный эффект на пролиферативную активность клеток STS26T. Контрольные шванновские клетки iHSC продемонстрировали устойчивость к GST-PID (Рис. 19).

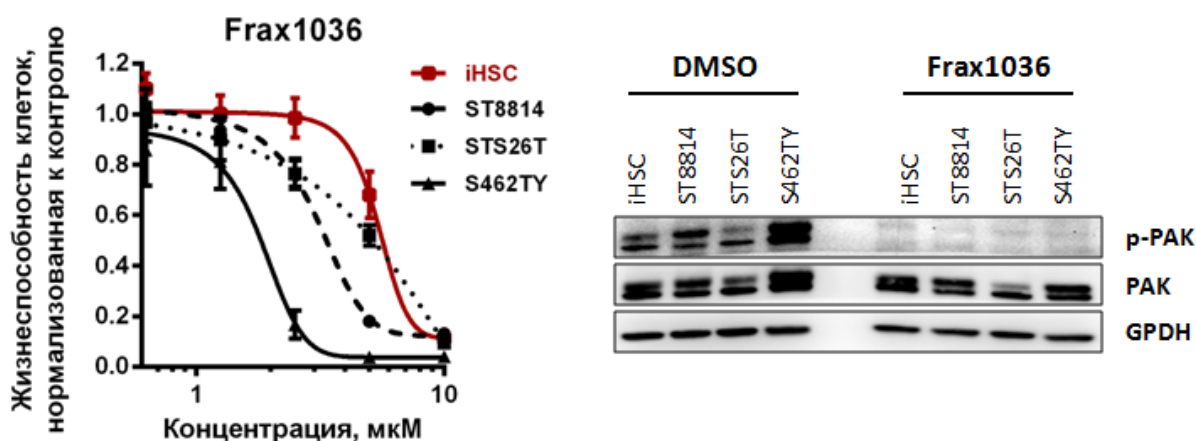


**Рисунок 19.** Влияние ингибитора PAK1/2/3 GST-PID на рост клеток трёх линий MPNST и нормальных иммортализованных шванновских клеток iHSC.

Кривые роста клеток MPNST и iHSC, трансдуцированных рBMN-GST-PID (PID) или контрольным вектором рBMN-I-GFP (Контроль). Вестерн-блот анализ уровня фосфо-PAK1/2/3 и PAK1/2/3 в этих клетках.

Эксперименты выполнены в трёх биологических повторах. Данные представлены в виде среднего значения и стандартного отклонения (\*= $p<0.05$ , \*\*\*= $p<0.005$ ).

Для фармакологического ингибирования PAK1/2/3 клетки MPNST и iHSC экспонировали Frax1036 в концентрациях от 5 нМ до 10 мкМ, в течение 72 ч, после чего строили кривые выживаемости (кривые доза/эффект) (Рис. 20) и рассчитывали полумаксимальную эффективную концентрацию ( $EC_{50}$ ) для каждой клеточной линии (Рис 21). Для подтверждения инактивации PAK1/2/3 вестерн-блот анализ уровней PAK1/2/3 и фосфо-PAK1/2/3 в четырёх клеточных линиях проводили с использованием концентраций Frax1036, соответствующих их  $EC_{50}$ , через 24 ч после добавления ингибитора (Рис. 20).

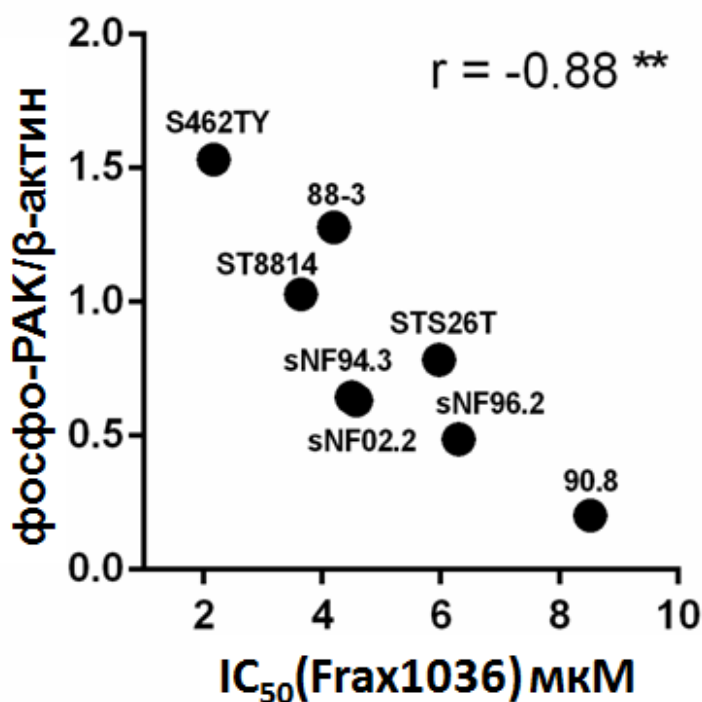


**Рисунок 20. Влияние ингибитора PAK1/2/3 Frax1036 на рост клеток MPNST и iHSC.**

Кривые доза/эффект для клеток MPNST и iHSC, экспонированных Frax1036. Вестерн-блот анализ уровня фосфо-PAK1/2/3 и PAK1/2/3 в этих клетках.

Эксперименты выполнены в трёх биологических повторах. Данные представлены в виде среднего значения и стандартного отклонения.

Аналогично GST-PID, Frax1036 эффективно подавлял фосфорилирование PAK1/2/3 в клетках линий S462TY, STS26T, ST8814 и iHSC и ингибировал рост клеток MPNST (Рис. 20). Чувствительность к Frax1036 коррелировала с уровнем фосфо-PAK1/2/3 в этих клетках (S462TY>ST8814>STS26T) (Рис. 20 и 21). Остальные имеющиеся в наличии клетки MPNST (90-8, ST88-3, sNF02.2, sNF96.2 и sNF94.3) показали умеренную чувствительность к Frax1036 (Рис. 21), однако, эффект Frax1036 на клеточный рост подобным образом соотносился с уровнем фосфо-PAK1/2/3.



Клеточная линия	iHSC	S462TY	STS26T	ST8814	88-3	sNF94.3	90.8	sNF02.2	sNF96.2
IC <sub>50</sub> (Frax1036), мкМ	6.4	2.17	5.97	3.64	4.2	4.5	8.52	4.57	6.3

**Рисунок 21. Корреляционное поле IC<sub>50</sub>(Frax1036) и уровня фосфо-PAK в клетках MPNST. IC<sub>50</sub>(Frax1036) для клеток MPNST и iHSC. r – коэффициент Пирсона (\*\*= p<0.01).**

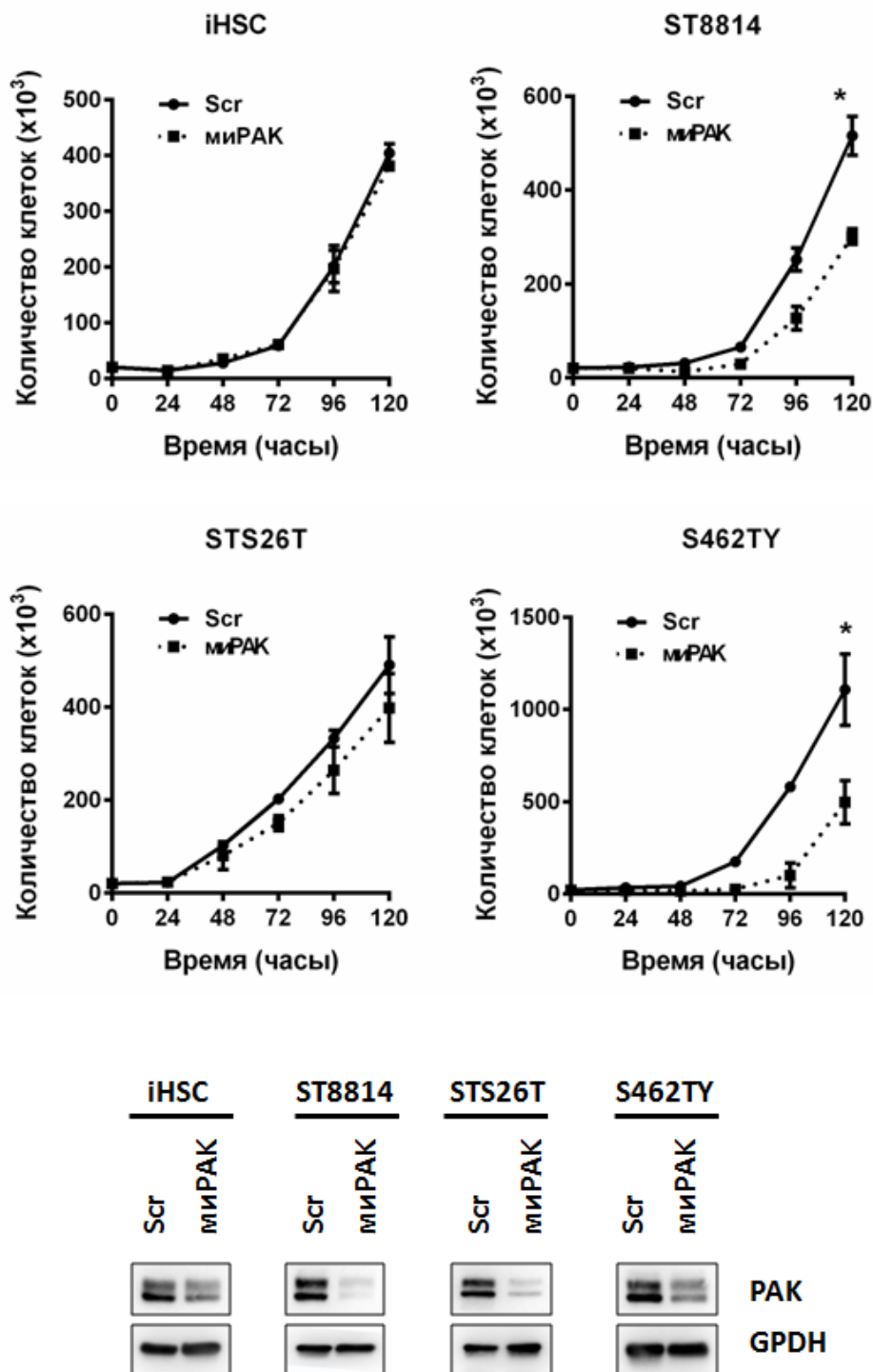


Для оценки корреляции между активностью РАК и чувствительностью к Fгах1036 проводили количественный анализ данных иммуноблоттинга на фосфо-РАК1/2/3 в клетках МРНСТ (Рис. 17) и сопоставляли их со значениями  $IC_{50}(Fгах1036)$  для этих клеток. Коэффициент Пирсона ( $r$ ) оказался равным  $-0.88$  ( $p=0.0042$ ), что соответствует обратной корреляции (Рис. 21).

В дополнение к ингибированию каталитической активности p21-активируемых киназ I группы, оценивали эффект их генетического нокдауна на пролиферацию клеток МРНСТ (Рис. 22).

iHSC и клетки МРНСТ линий S462TY, STS26T и ST8814 трансфицировали миРНК против *PAK1*, *PAK2* и *PAK3*. Клетки в контрольных группах трансфицировали рандомизированной миРНК. Через 24 ч после трансфекции равное количество клеток высевали на плашки, после чего подсчитывали количество живых клеток каждые 24 ч в течение 5 последующих дней. Вестерн-блот анализ нокдауна РАК проводили через 72 ч после трансфекции. Нокдаун *PAK1/2/3* имел незначительный эффект на рост клеток STS26T и iHSC, однако, эффективно ингибировал пролиферацию клеток S462TY и ST8814 (Рис. 22).

Таким образом, данные, полученные в экспериментах с использованием ингибиторов РАК1/2/3, были подтверждены генетическим нокдауном. Обнаруженная взаимосвязь между активностью РАК в клетках МРНСТ и их чувствительностью к выключению РАК позволяет предположить, что уровень фосфо-РАК1/2/3 может быть использован в качестве потенциального биомаркера для предсказания терапевтического ответа МРНСТ на воздействие ингибиторов РАК.



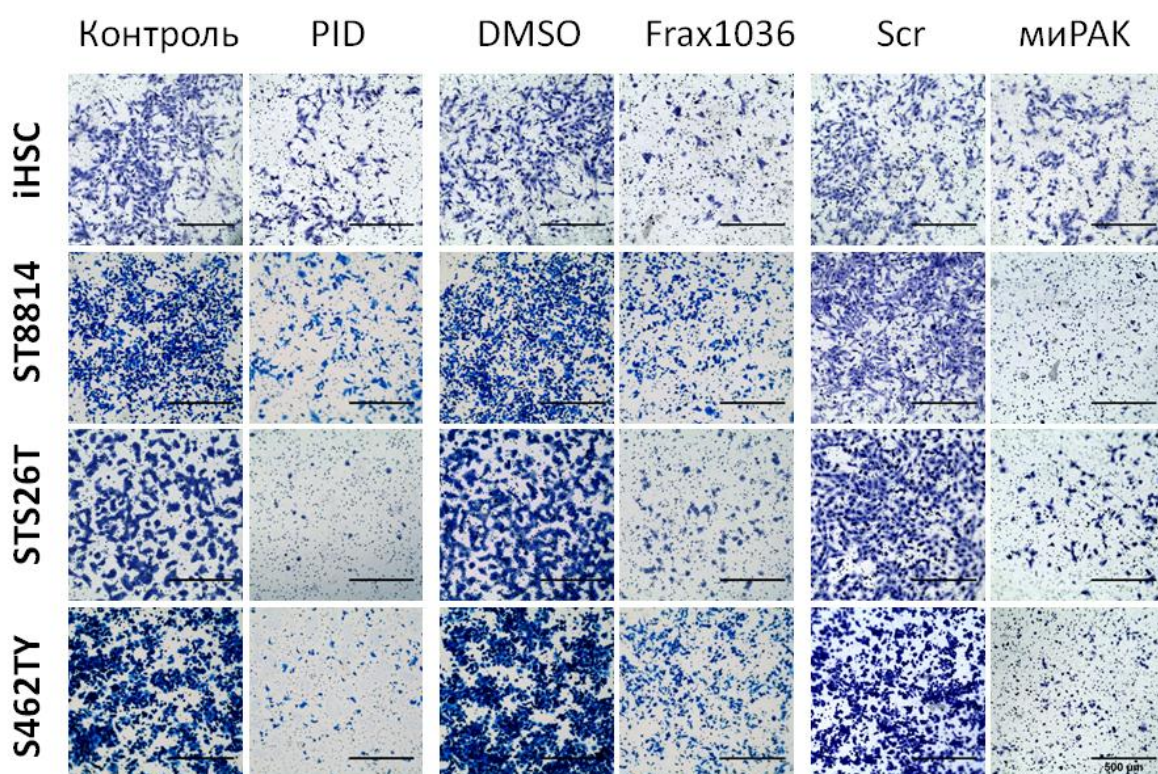
**Рисунок 22. Влияние генетического нокада на *PAK1/2/3* на рост клеток MPNST и iHSC.**

Кривые роста клеток MPNST и iHSC, трансфицированных миРНК против *PAK1/2/3* (миРАК) или контрольной рандомизированной миРНК (Scr – scrambled). Вестерн-блот анализ уровня *PAK1/2/3* в этих клетках.

Эксперименты выполнены в трёх биологических повторах. Данные кривых роста представлены в виде среднего значения и стандартного отклонения (\*=  $p < 0.05$ ).

#### 4.2.3. Влияние выключения PAK1/2/3 на клеточную инвазию MPNST

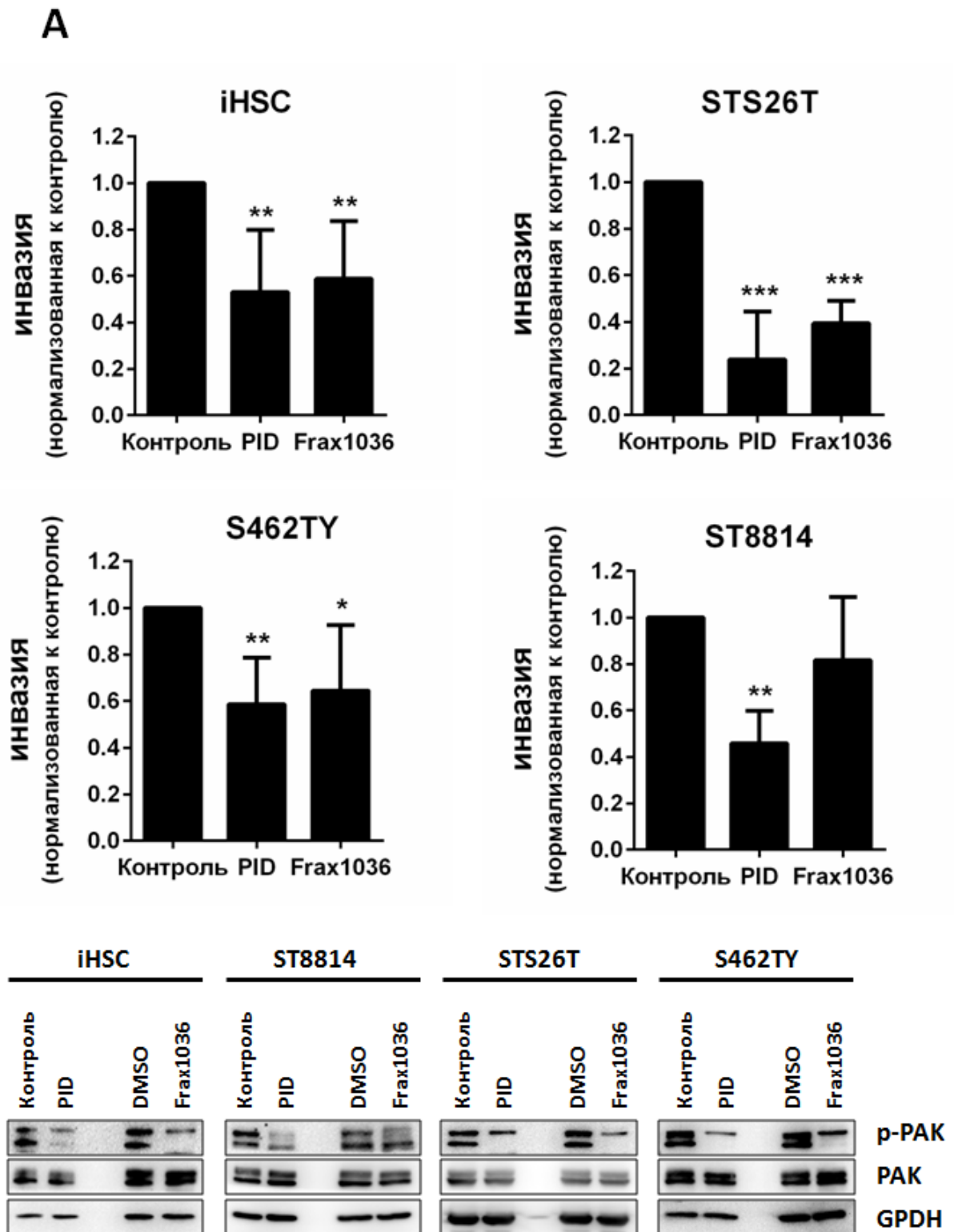
Для того чтобы определить, принимают ли белки PAK1/2/3 участие в распространении злокачественных опухолей оболочек периферических нервов, в экспериментах *in vitro* оценивали изменение инвазивной способности клеток MPNST и iHSC под воздействием ингибиторов PAK или миРНК против генов PAK (Рис. 23).

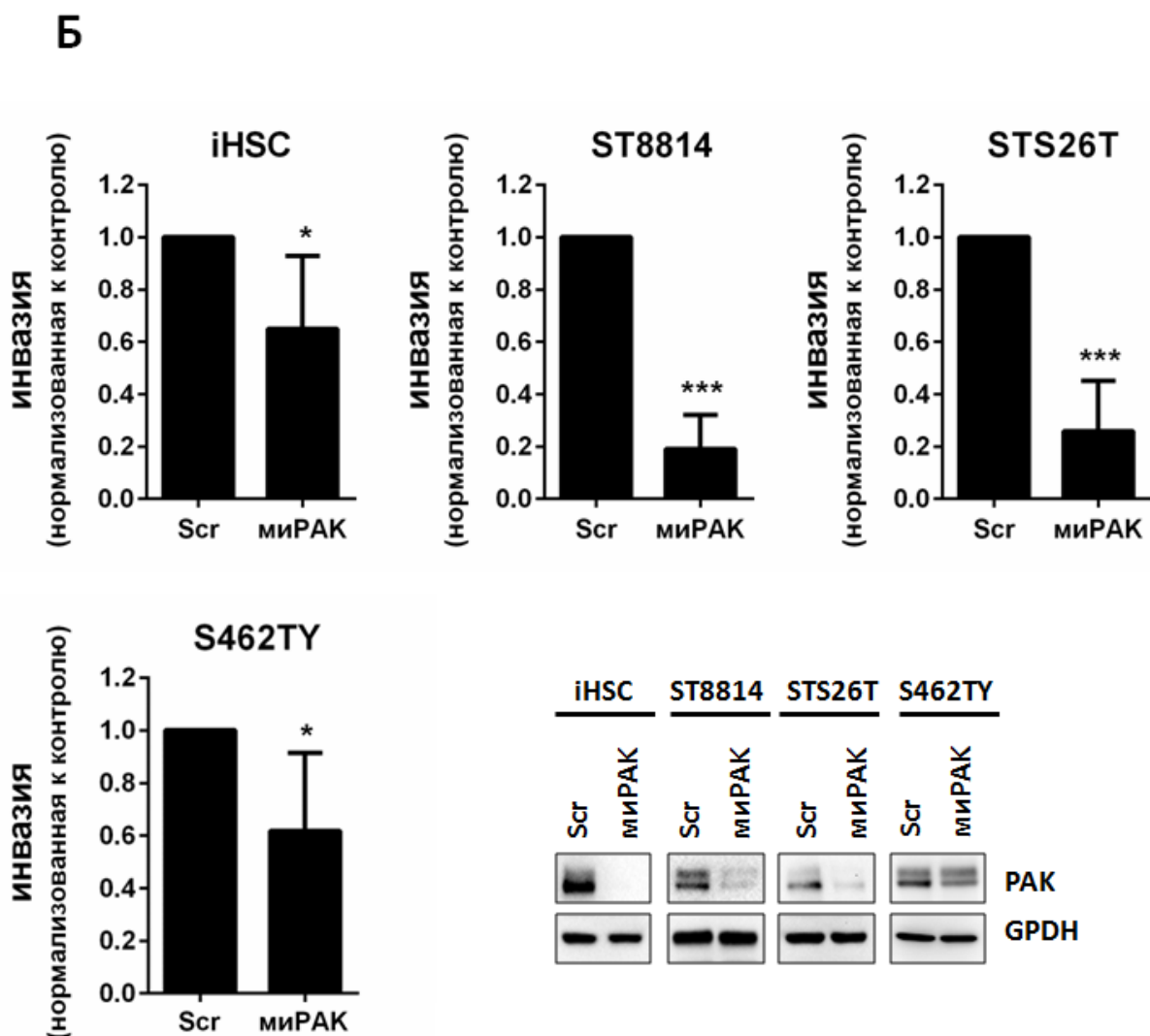


**Рисунок 23. Репрезентативные фотографии клеток MPNST и iHSC, проникших через матригель в модифицированных камерах Бойдена.** В качестве контролей для GST-PID (PID) использовали «пустой» вектор (Контроль), для Frax1036 – растворитель DMSO, для миРНК против PAK (миПАК) – рандомизированную миРНК (Scr).

миРНК и GST-PID использовали, как описано в Главе 4.2.2. Для уменьшения эффекта на клеточную пролиферацию, использовали концентрацию Frax1036, достаточную для подавления жизнеспособности клеток на 10-20% (1 мкМ). Значительное снижение клеточной инвазии

наблюдали в клетках, продуцирующих GST-PID, а также клетках, обработанных Frax1036, по сравнению с контролями (Рис. 24А).





**Рисунок 24. Влияние ингибирования PAK1/2/3 и генетического нокадауна PAK1/2/3 на инвазию клеток MPNST и iHSC *in vitro*.**

А) Доля клеток, проникших через матригель в присутствии GST-PID и Fгах1036, нормализованная к контролю. Вестерн блот анализ уровня тотальных и фосфорилированных PAK1/2/3 в контрольных и экспериментальных клетках.

Б) Доля клеток, проникших через матригель после трансфекции миРНК против PAK1/2/3 (миPAK), нормализованная к контролю (Scr). Вестерн блот анализ уровня PAK1/2/3 в контрольных и экспериментальных клетках. Эксперименты выполнены в трёх биологических повторах. Данные представлены в виде среднего значения и стандартного отклонения (\*= $p < 0.05$ , \*\*= $p < 0.01$ , \*\*\*= $p < 0.005$ ).

Подобные результаты были получены в экспериментах с использованием РНК-интерференции - нокдаун *PAK1/2/3* эффективно подавлял инвазию *iHSC*, *S462TY*, *STS26T* и *ST8814* (Рис. 24Б).

Эти данные показывают, что РАК I группы могут выполнять регуляторную функцию в инфильтрации клетками опухолей прилежащих тканей и метастазировании. Интересно, что нокдаун и ингибирование *PAK1/2/3* эффективно подавляли инвазию как клеток *MPNST*, так и иммортализованных шванновских клеток. Очевидно, механизм регуляции клеточной инвазии, опосредованный *PAK1/2/3*, не является уникальным для клеток *MPNST*. Эти результаты подтверждают ранее полученную информацию о фундаментальной роли РАК в движении клеток [178].

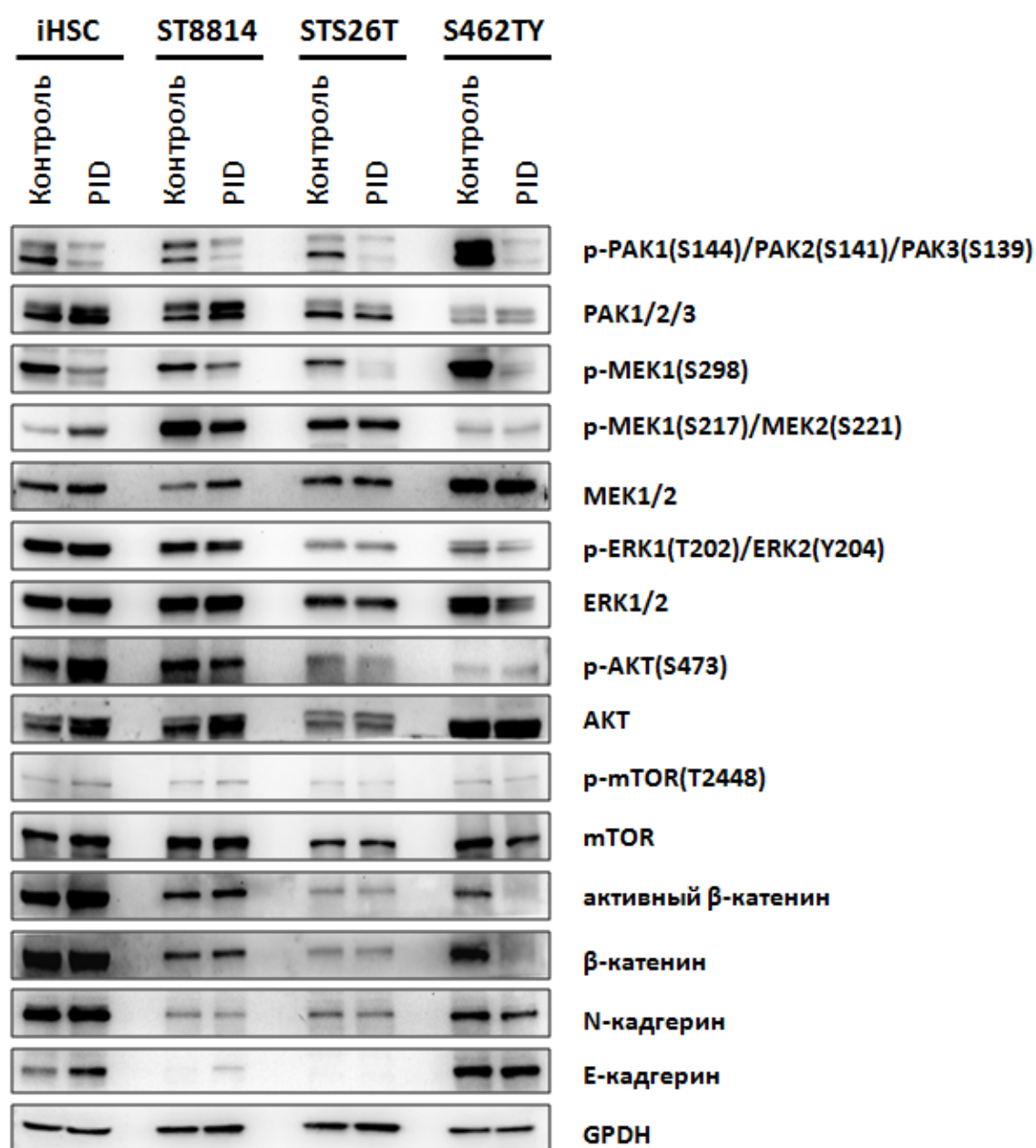
#### **4.3. Изучение роли РАК1/2/3 во внутриклеточной сигнализации MPNST**

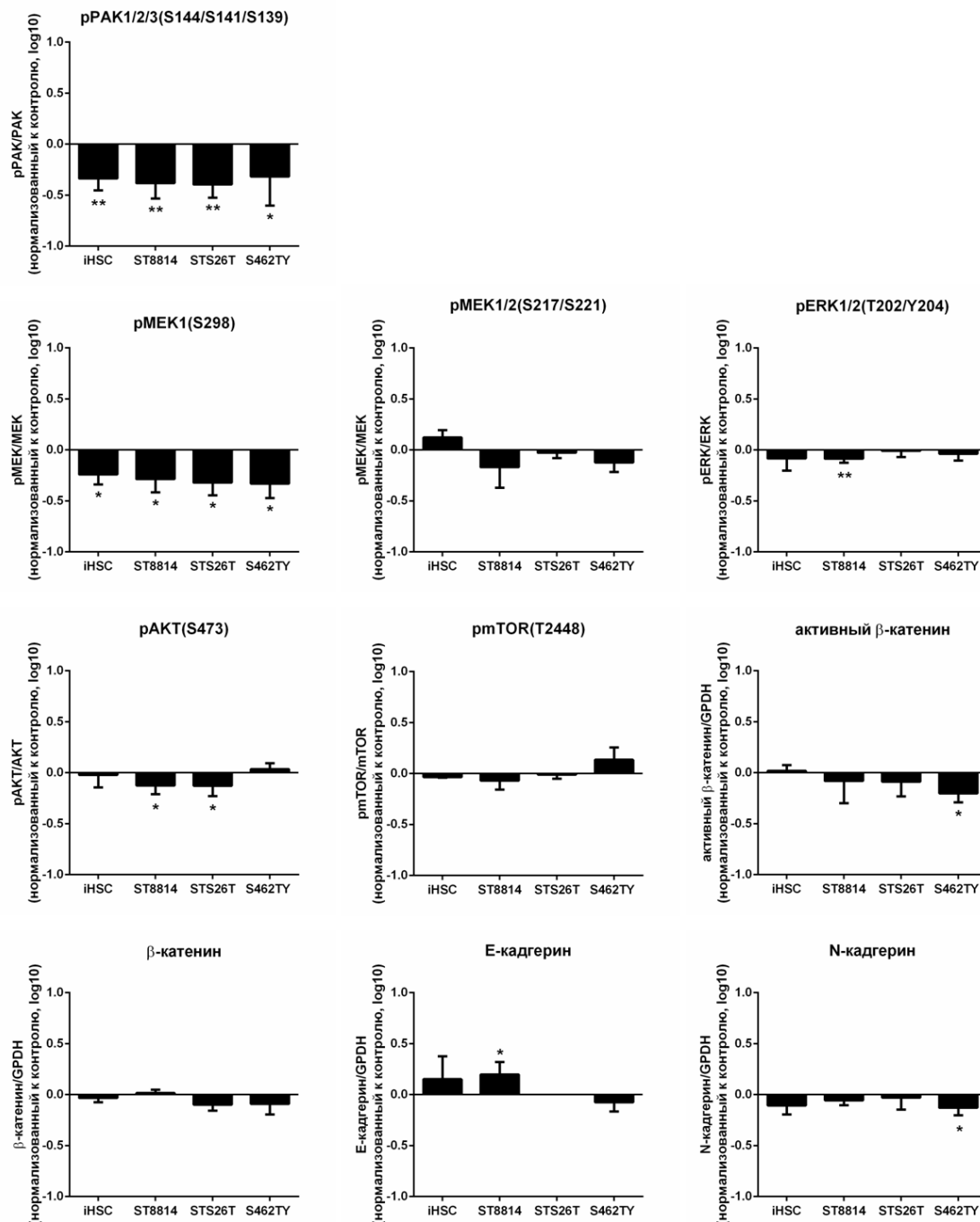
Для того чтобы изучить механизмы, посредством которых *PAK1/2/3* регулирует клеточный рост и инвазию *MPNST*, в клетках *MPNST* и *iHSC*, экспонированных *FraX1036*, *GST-PID* или миРНК против *PAK1/2/3*, была проанализирована активность ключевых сигнальных каскадов.

К таким каскадам относится сигнальный путь *RAF*>*MEK*>*ERK* (каскад *MAPK/ERK*), который играет важнейшую роль в биологии опухолей оболочек периферических нервов [19]. Из литературных данных известно, что в некоторых типах клеток *PAK1/2/3* активируют *MAPK/ERK* путём фосфорилирования *c-RAF* и *MEK1* по остаткам серина ([*S338*] и [*S298*], соответственно) [179-182].

Как и предполагалось, экспрессия *GST-PID* и обработка *FraX1036* в значительной степени подавляла автофосфорилирование *PAK1/2/3* и фосфорилирование *MEK1* по *S298* (Рис. 25 и 26). Однако уровень фосфо-*MEK1/2/3* [*S217/S221/S139*], отражающий каталитическую активность

MEK1/2 [176], существенно не изменялся в клетках под давлением ингибиторов РАК. Отсутствие эффекта Frax1036 и GST-PID на активацию MEK был подтверждён иммуноблоттингом на фосфо-ERK: из четырех испытываемых клеточных линий только в клетках ST8814, обработанных Frax1036, было выявлено статистически значимое изменение активности ERK (Рис. 26).





**Рисунок 25. Влияние GST-PID на сигнализацию MAPK/ERK, АКТ, β-катенина и продукцию кадгеринов.**

Вестерн блот анализ активности каскадов MAPK/ERK, АКТ>mTOR и β-катенина, а также уровней N- и Е-кадгерина в клетках MPNST и iHSC, трансдуцированных pBMN-GST-PID (PID) или контрольным вектором pBMN-I-GFP (Контроль). Количественная оценка изменения уровней белков и фосфо-белков.

Эксперименты выполнены в трёх биологических повторах. Данные представлены в виде среднего значения и стандартного отклонения (\*= $p < 0.05$ , \*\*= $p < 0.01$ , \*\*\*= $p < 0.005$ ).



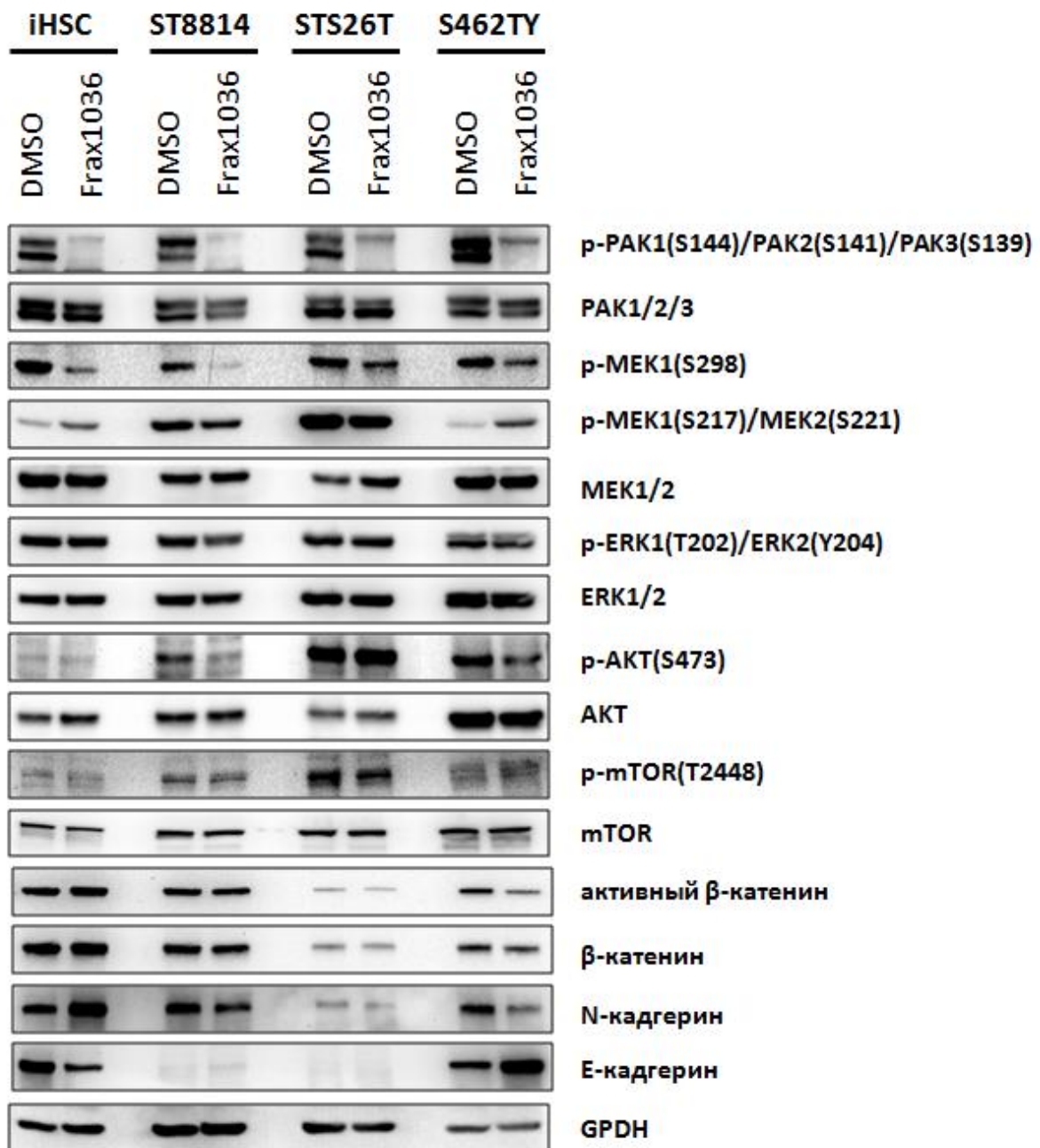
Подобные результаты были получены для клеток MPNST и iHSC, в которых RAK1/2/3 были выключены миРНК (Рис. 27). Таким образом, в отличие от многих других клеточных типов, в клетках MPNST фосфорилирование MEK1 по S298 не является обязательным для активации MEK, и регуляция ERK в этих клетках может осуществляться без участия RAK I группы.

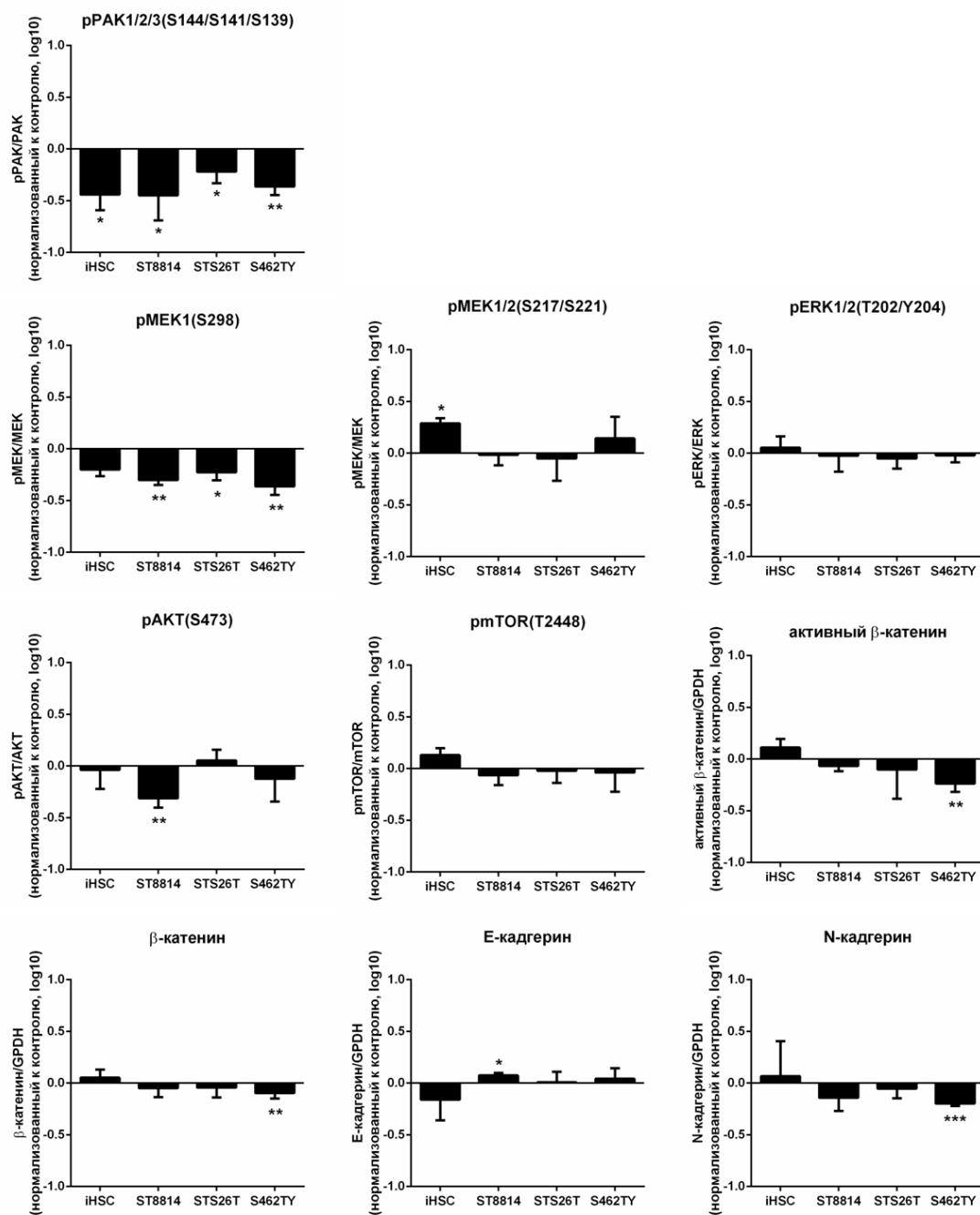
Функционирование другого киназного каскада, играющего одну из ключевых ролей в патогенезе опухолей оболочек периферических нервов, - PI3K (PI3K>PKB/АКТ>mTOR) [12, 17] – может быть тесно связано с RAK1/2/3. Было показано, что RAK I группы регулируют активацию киназ PKB/АКТ, выполняя адаптерную функцию для 3-фосфоинозитол зависимой протеинкиназы 1 (phosphoinositide-dependent protein kinase 1, PDK1) [47] или путём прямого фосфорилирования АКТ [183]. Мы обнаружили, что ингибиторы RAK, а также миРНК против *RAK1/2/3* подавляют фосфорилирование АКТ в двух из трёх испытываемых линий MPNST (ST8814 и S462TY) (Рис. 25, 26, 27).

Из литературных данных известно, что канонический сигнальный каскад Wnt (Wnt> $\beta$ -катенин), регулирующий инициацию и развитие MPNST [6, 14, 15], может быть активирован RAK [48, 184]. Мы изучили эффект ингибирования RAK на активность  $\beta$ -катенина в четырёх клеточных линиях. Клетки MPNST ST8814, STS26T и S462TY показали снижение активного (не фосфорилированного по S33/S37/T41)  $\beta$ -катенина. Эти данные позволяют предположить, что RAK1/2/3 может способствовать росту, инвазии и метастазированию клеток MPNST посредством стабилизации  $\beta$ -катенина.

На основании того что  $\beta$ -катенин регулирует клеточную инвазию, в частности, за счёт контроля экспрессии генов молекул адгезии [185, 186], мы исследовали изменение уровней продукции N- и E-кадгеринов в клетках под воздействием ингибиторов RAK1/2/3. Снижение уровня E-

кадгерина и увеличение продукции N-кадгерина в опухолевых клетках, как правило, коррелирует с увеличением их инвазивного потенциала [187]. В норме зрелые миелинизирующие шванновские клетки продуцируют E-кадгерин – важнейший компонент адгезионных контактов, в то время как N-кадгерин является маркёром подвижных предшественников шванновских клеток [188].



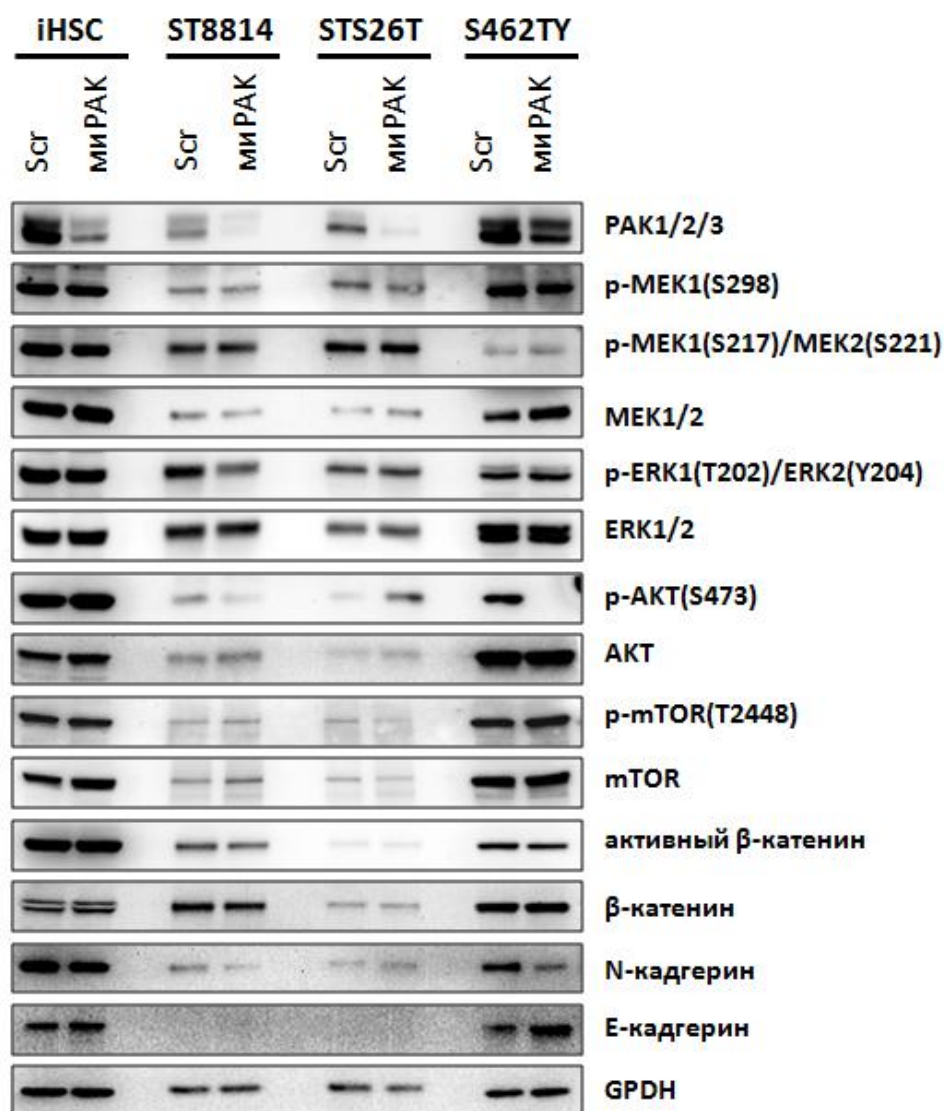


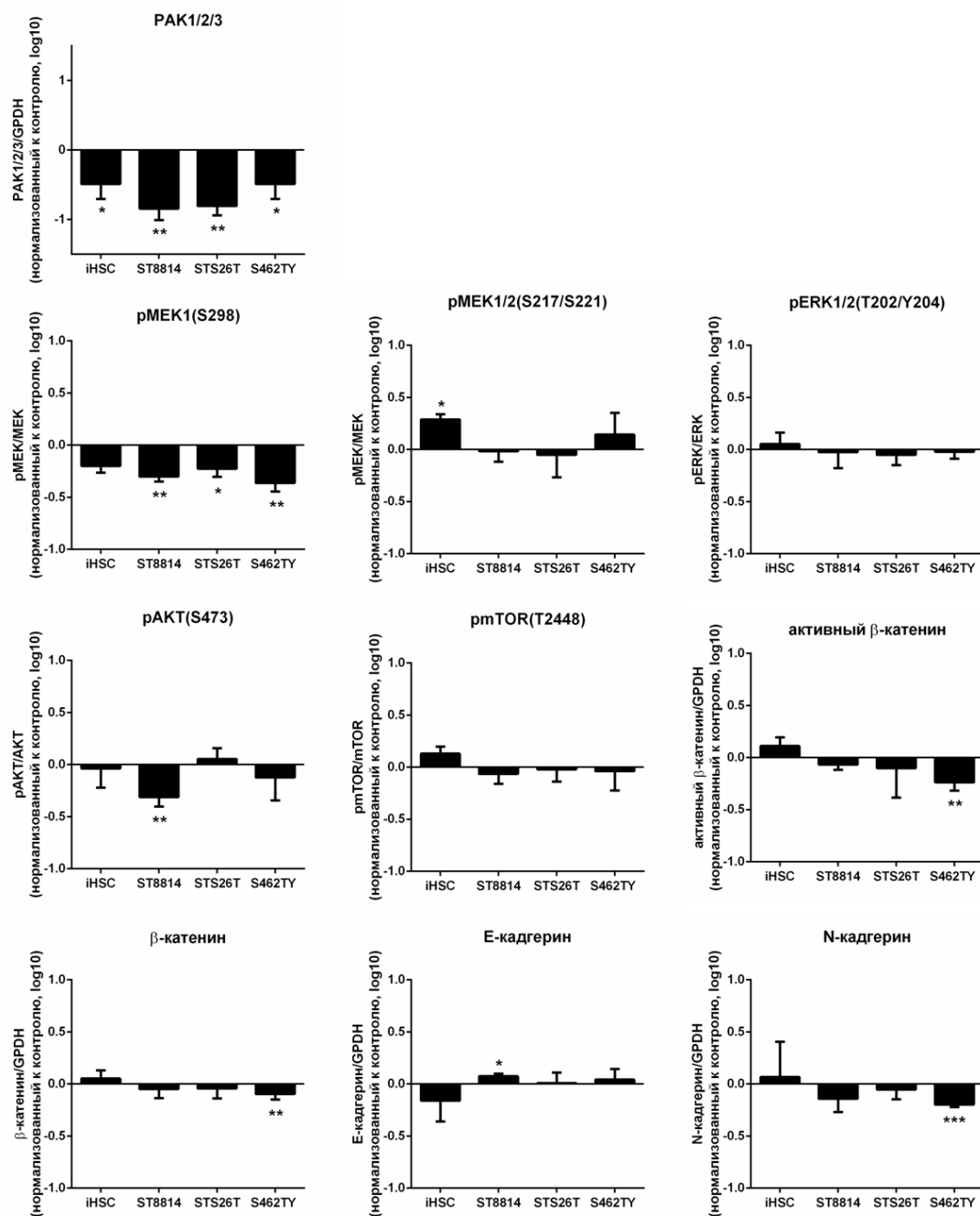
**Рисунок 26. Влияние Fгах1036 на сигнализацию MAPK/ERK, АКТ, β-катенина и продукцию кадгеринов.**

Вестерн блот анализ активности каскадов MAPK/ERK, АКТ>mTOR и β-катенина, а также уровней N- и Е-кадгерина в клетках MPNST и iHSC, обработанных Fгах1036 или DMSO. Количественная оценка изменения уровней белков и фосфо-белков. Эффекты Fгах1036 оценивали через 24 ч после добавления ингибитора в концентрациях, соответствующих IC<sub>50</sub> для четырёх клеточных линий, в полной ростовой среде.

Эксперименты выполнены в трёх биологических повторах. Данные представлены в виде среднего значения и стандартного отклонения (\*= $p<0.05$ , \*\*= $p<0.01$ , \*\*\*= $p<0.005$ ).

Иммуноблоттинг клеточных лизатов MPNST показал, что S462TY, STS26T и ST8814 продуцируют N-кадгерин, уровень которого снижается в отсутствие активного PAK1/2/3 (Рис. 25, 26 и 27). В клетках линии ST8814, продуцирующих GST-PID или обработанных Frax1036, происходила замена N-кадгерина на E-кадгерин, характерная для дифференцировки шванновских клеток. Таким образом, можно предположить, что PAK I группы регулируют инвазию и метастазирование MPNST, по крайней мере, отчасти, посредством контроля экспрессии молекул адгезии.





**Рисунок 27. Влияние нокдауна *PAK1/2/3* на сигнализацию MAPK/ERK, АКТ, β-катенина и продукцию кадгеринов.**

Вестерн блот анализ активности каскадов MAPK/ERK, АКТ>mTOR и β-катенина, а также уровней N- и E-кадгерина в клетках MPNST и iHSC, трансфицированных миРНК против *PAK1/2/3* (миПАК) или контрольной рандомизированной миРНК (Scr). Количественная оценка изменения уровней белков и фосфо-белков

Эффекты миРНК оценивали через 72 ч после трансфекции в полной ростовой среде. Эксперименты выполнены в трёх биологических повторах. Данные представлены в виде среднего значения и стандартного отклонения (\*= $p<0.05$ , \*\*= $p<0.01$ , \*\*\*= $p<0.005$ ).

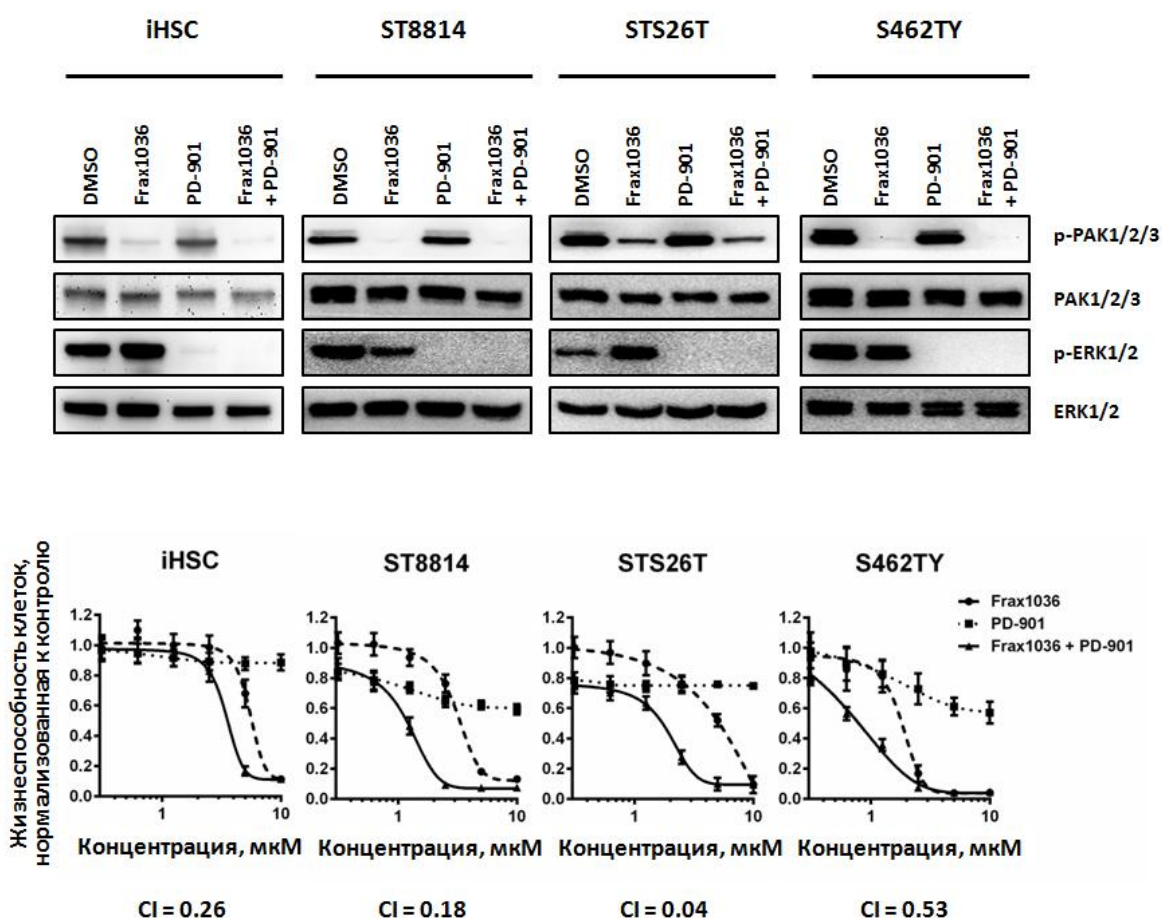
Как видно из рисунков 25, 26 и 27, ингибирование и нокдаун РАК в клеточных линиях MPNST модулирует активность сигнальных путей MAPK/ERK, PI3K и канонического каскада Wnt с различной эффективностью. Важно отметить, что клетки с более высоким уровнем фосфо-РАК 1/2/3 (ST8814 и, особенно, S462TY) были более чувствительны к ингибиторам РАК1/2/3 и показали более значительное изменение активации АКТ,  $\beta$ -катенина и экспрессии кадгеринов в ответ на выключение РАК1/2/3. В клетках STS26T (спорадическая клеточная линия MPNST с низким уровнем фосфо-РАК1/2/3 и слабой чувствительностью к ингибиторам РАК), а также контрольных iHSC, активность данных каскадов существенно не изменялась. Наиболее неожиданным результатом оказалась стабильная активация ERK во всех клеточных линиях в присутствии Frax1036, GST-PID и миРНК против РАК.

#### **4.4. Индивидуальное и сочетанное воздействие ингибиторов РАК1/2/3 (Frax1036) и MEK1/2 (PD0325901) на рост и распространение MPNST**

##### **4.4.1. Синергическое воздействие Frax1036 и PD0325901 на клетки MPNST *in vitro***

Сигнализация MEK>ERK играет важнейшую роль в биологии MPNST [19]. Принимая во внимание то, что самостоятельная инактивация РАК1/2/3 не является достаточной для подавления фосфорилирования ERK (Глава 4.3.), мы предположили, что добавление ингибитора MEK может усилить антипролиферативный эффект Frax1036. Мы использовали аллостерический ингибитор MEK1/2 PD0325901 (PD-901) [189], который был ранее испытан в ряде доклинических исследований и продемонстрировал умеренную эффективность в качестве индивидуального терапевтического агента в моделях MPNST [18, 19]. В

клинических испытаниях, однако, PD-901 не соответствовал первичным критериям эффективности и вызывал ряд побочных эффектов [190-192]. Таким образом, актуальной задачей является поиск новых комбинаций препаратов, эффективно подавляющих рост опухолей и минимизирующих токсичность. Мы обнаружили, что PD-901 предотвращает фосфорилирование ERK и угнетает пролиферацию клеток MPNST ST8814, STS26T и S462TY синергично с Frax1036 (Рис. 28).



**Рисунок 28. Синергический эффект ингибиторов PAK1/2/3 (Frax1036) и MEK1/2 (PD-901) на жизнеспособность клеток MPNST и iHSC.**

Вестерн блот анализ уровней фосфорилированных и общих белков PAK1/2/3 и ERK1/2 в клетках MPNST и iHSC, обработанных DMSO, Frax1036, PD-901 или комбинацией Frax1036 и PD-901. Кривые доза-эффект клеток, обработанных Frax1036 и PD-901. Комбинационные индексы (CI) сочетанного воздействия Frax1036 и PD-901.

Эксперименты выполнены в трёх биологических повторах. Данные кривых выживаемости представлены в виде среднего значения и стандартного отклонения.

Анализ данных, полученных после обработки клеток MPNST разведениями соответствующих полумаксимальных эффективных концентраций (IC<sub>50</sub>) Frax1036 и PD-901, показал, что комбинационные индексы (CI) для всех клеточных линий были меньше 1, что соответствует синергическому взаимодействию [175]. Аналогично, Frax1036 и PD-901 синергично подавляли жизнеспособность контрольных iHSC, однако, более высокие дозы ингибиторов потребовались для достижения биологического эффекта (Рис. 28).

Исходя из полученных данных, можно сделать вывод о целесообразности использования сочетания Frax1036 и PD-901 в качестве новой экспериментальной терапии MPNST в моделях *in vivo*.

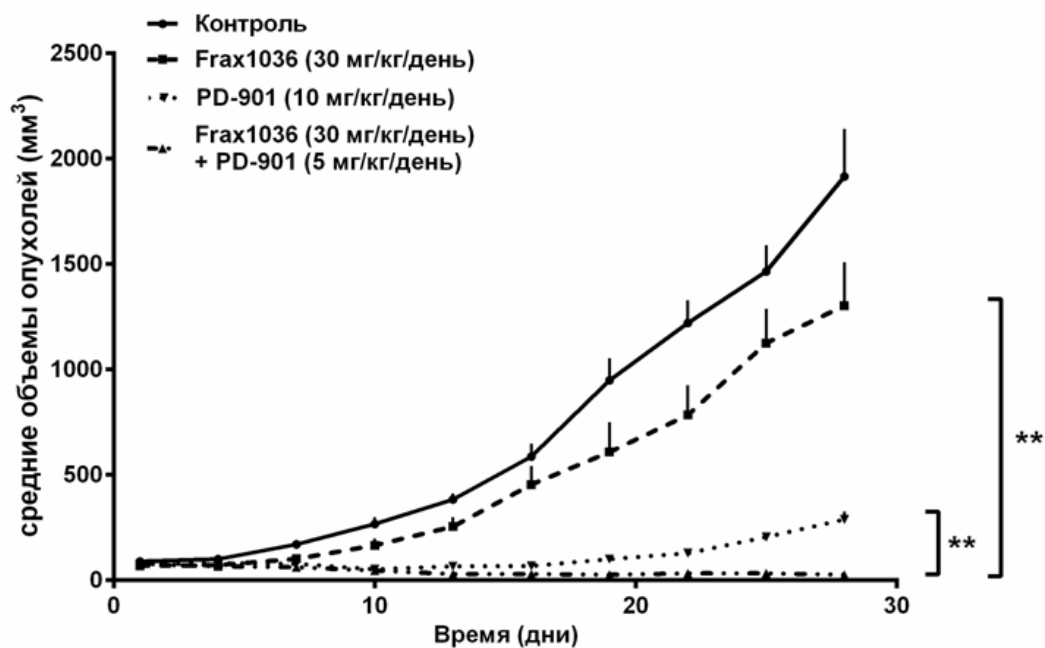
#### **4.4.2. Влияние Frax1036 и PD0325901 на рост подкожных ксенографтных MPNST**

Для того чтобы определить, подтверждаются ли наблюдения, полученные на клеточных моделях, в экспериментах *in vivo*, была исследована противоопухолевая активность ингибитора RAK1/2/3 Frax1036 как индивидуального терапевтического агента и в комбинации с ингибитором MEK1/2 PD-901 в модели подкожных ксенографтов MPNST на линии бестимусных мышей *Nude*.

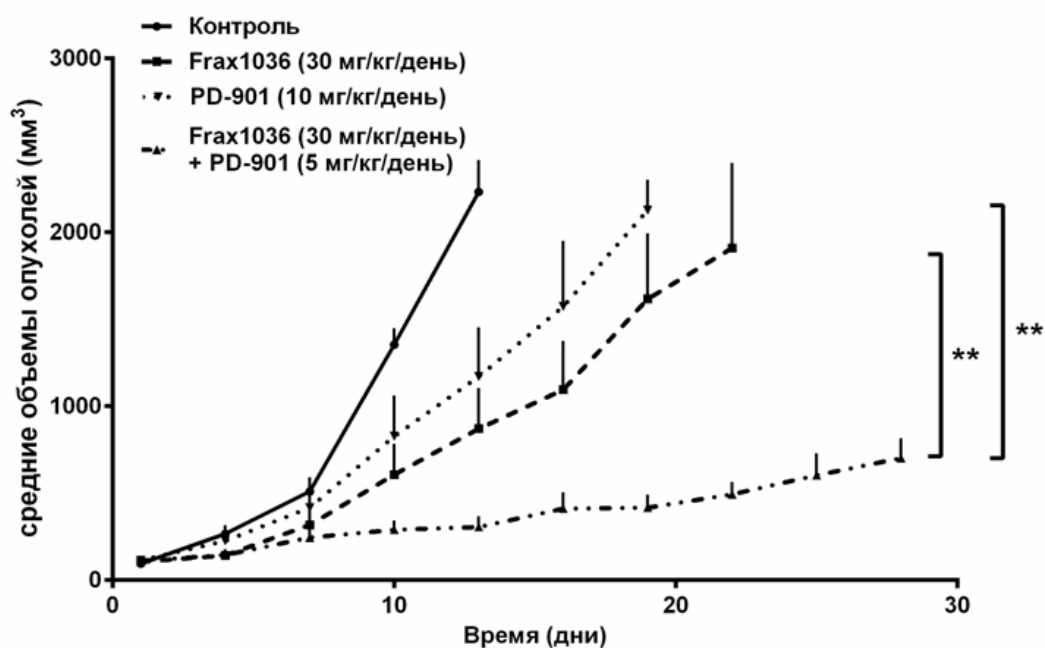
Ксенографтные опухоли были индуцированы клетками MPNST S462TY и STS26T – из всех испытываемых клеточных линий только эти клетки являются туморогенными, т.е. способными образовывать опухоль в месте их введения лабораторным животным. Экспериментальную терапию начинали после появления опухолей (средний размер составлял ~ 100 мм<sup>3</sup>) (Рис. 29).



### STS26T



### S462TY



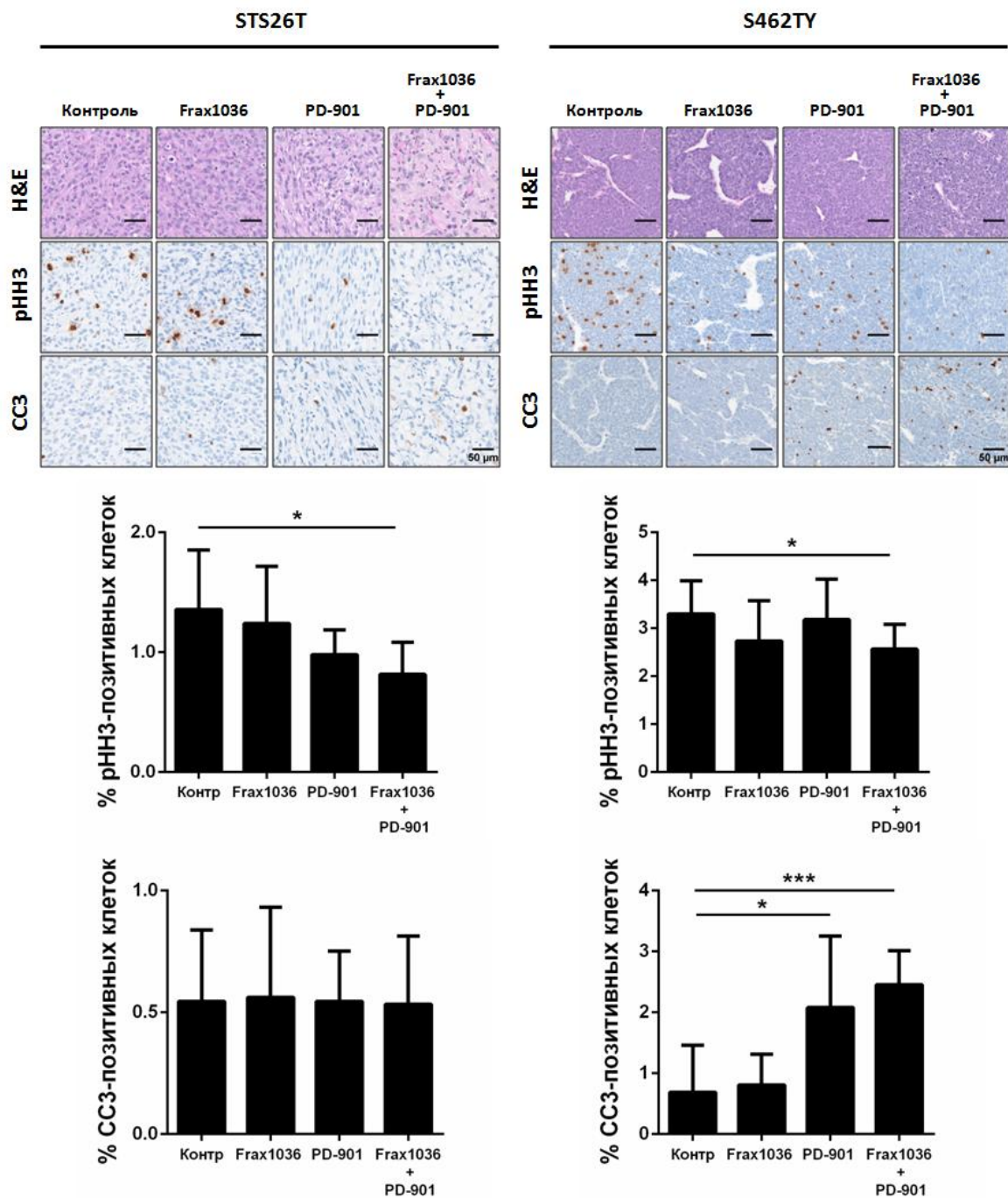
**Рисунок 29. Изменение объёмов опухолей STS26T и S462TY у мышей в контрольных группах и группах, получавших Frax1036, PD-901 или комбинацию Frax1036 и PD-901.**

Данные представлены в виде среднего значения и ошибки среднего (\*\*= $p < 0.01$ ).

Мыши с опухолями были разделены на 4 группы, которые получали плацебо, Frax1036 (30 мг/кг/день), PD-901 (10 мг/кг/день) или комбинацию Frax1036 (30 мг/кг/день) и PD-901 (5 мг/кг/день) в течение 4 недель (Рис. 29). Индивидуальная терапия Frax1036 незначительно замедляла рост ксенографтных опухолей STS26T (~1302.09 мм<sup>3</sup> против ~1915.5 мм<sup>3</sup> в контрольной группе в конце эксперимента,  $p = 0.051$ ), в то время как объёмы опухолей у мышей, получавших PD-901, были существенно меньше контрольных (~288 мм<sup>3</sup>,  $p = 0.002$ ), а комбинация Frax1036 и PD-901 вызывала регрессию опухолей STS26T (~25.7 мм<sup>3</sup>,  $p = 0.002$ ) (Рис. 29).

Через 28 дней после начала лечения мышей усыпляли и собирали ткани ксенографтных опухолей. Гистологический анализ выявил значительное снижение числа клеток, иммунореактивных к маркёру пролиферации фосфо-гистону H3 (pHH3), в опухолях, экспонированных комбинации Frax1036 и PD-901. В этих опухолях, однако, не было выявлено апоптотического процесса, как показало окрашивание на расщеплённую каспазу 3 (CC3). Эти результаты указывают на то, что в конце длительного периода терапии Frax1036 и PD-901, преобладал цитостатический эффект (Рис. 30).

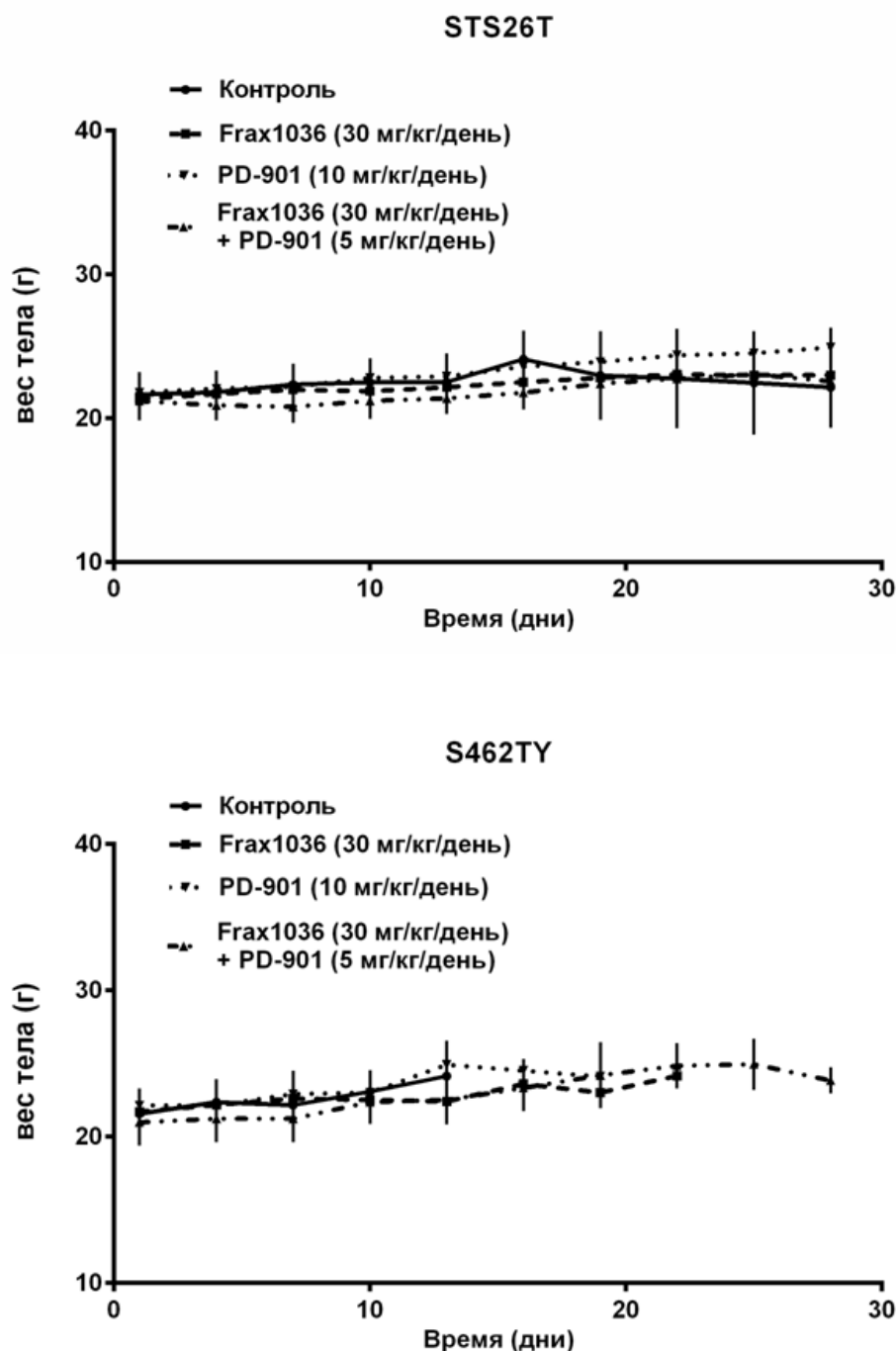
В аналогичном эксперименте с использованием ксенографтов S462TY, только мыши, получавшие комбинацию Frax1036 и PD-901, дожили до последнего, 28 дня эксперимента (объём опухолей составлял ~700.4 мм<sup>3</sup>). Из-за достижения опухолями веса более 10% массы тела, мышей в контрольной группе усыпили на 13 день эксперимента (~2241.1 мм<sup>3</sup>), мышей, получавших PD-901, - на 19 день (~2231.1 мм<sup>3</sup>), а мышей, получавших Frax1036, - на 22 день (~2232.4 мм<sup>3</sup>) (Рис. 29). Иммуногистохимическое исследование показало не только снижение уровня pHH3, но и увеличение интенсивности окрашивания на CC3 опухолевых тканей в группе, прошедшей сочетанную терапию (Рис. 30).



**Рисунок 30. Иммуногистохимический анализ фосфо-гистона H3 (pHH3) и расщеплённой каспазы 3 (CC3) в контрольных и экспериментальных группах MPNST STS26T и S462TY.**

Данные представлены в виде среднего значения и ошибки среднего (\*= $p < 0.05$ , \*\*\*= $p < 0.005$ ).

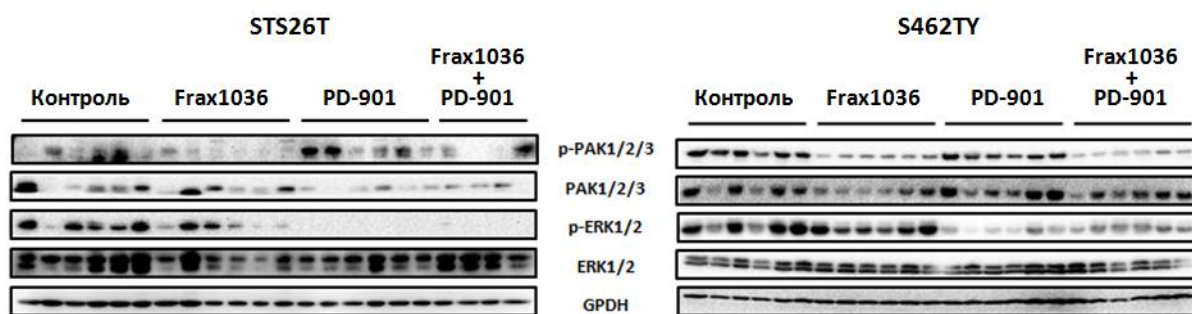
Терапия хорошо переносилась животными во всех экспериментальных группах и не выявила выраженной токсичности (Рис. 31).



**Рисунок 31. Средний вес тела животных контрольных групп и групп, получавших Frax1036, PD-901 или комбинацию Frax1036 и PD-901.**

Данные представлены в виде среднего значения и ошибки среднего.

Инактивация PAK1/2/3 и ERK1/2 с помощью Frax1036 and PD-901 была подтверждена вестерн блот анализом опухолевых лизатов (Рис. 32) Так же как в экспериментах *in vitro*, терапия Frax1036 в обеих ксенографтных моделях (STS26T и S462TY) существенно не изменяла уровень фосфорилирования ERK1/2.



**Рисунок 32. Вестерн-блот анализ общих и фосфорилированных белков PAK1/2/3 и ERK1/2 в лизатах ксенографтных MPNST.**

Как показали наши эксперименты с использованием мышинной ксенографтной модели MPNST, применение ингибиторов PAK1/2/3 как самостоятельных агентов может быть эффективно в случае терапии опухолей с высокой исходной активностью PAK1/2/3. Рост MPNST, в клетках которых уровень фосфорилирования PAK1/2/3 значительно не увеличен по сравнению с нормальными шванновскими клетками, очевидно, слабо зависит от каталитической активности PAK. Можно предположить, что ингибиторы PAK1/2/3 будут оказывать обратимый цитостатический эффект на клетки таких опухолей. Эти данные согласуются с наблюдениями, полученными в экспериментах с использованием клеточных моделей MPNST (Глава 4.2.2.). Как и в случае модели *in vitro* (Глава 4.3.), в экспериментах с животными подавление клеточной пролиферации MPNST ингибитором PAK1/2/3 Frax1036 было не связано с инактивацией ERK (Рис. 32). Экспериментальная терапия

комбинацией ингибитора РАК Frax1036 и ингибитора МЕК PD-901 позволила добиться устойчивого цитотоксического эффекта в отношении ксенографтных MPNST, индуцированных клетками линии S462TY с высоким фосфо-РАК1/2/3 (Рис. 30). Комбинация Frax1036 и PD-901 в модели ксенографтов STS26T хотя и вызывала регрессию опухолей (Рис. 29), не приводила к полному исчезновению MPNST. В конце эксперимента (28 день) опухоли были выделены из каждого животного в группе, проходившей сочетанную терапию, и иммуногистохимический анализ не выявил апоптотического процесса в тканях (Рис. 30). Эти данные позволяют предположить, что комбинация Frax1036 и PD-901 может оказывать цитотоксический эффект на клетки MPNST с низким исходным уровнем активности РАК1/2/3 в течение короткого промежутка времени.

Важно отметить, что в комбинации с Frax1036 ингибитор МЕК PD-901 был использован в более низкой дозе (5 мг/кг/день), нежели в случае индивидуальной терапии PD-901 (10 мг/кг/день). Комбинация ингибиторов показала более выраженный противоопухолевый эффект в отношении MPNST по сравнению с индивидуальной терапией даже при пониженной дозе PD-901, не вызывая видимых побочных эффектов (Рис. 29 и 31).

#### **4.4.3. Влияние Frax1036 и PD0325901 на формирование и рост экспериментальных лёгочных метастазов MPNST**

Предрасположенность злокачественных опухолей оболочек периферических нервов к инвазии и метастазированию представляет собой важнейшее препятствие для терапии этих опухолей. В то время как большая часть исследований в данной области сфокусирована на молекулярных механизмах, регулирующих формирование и рост MPNST,

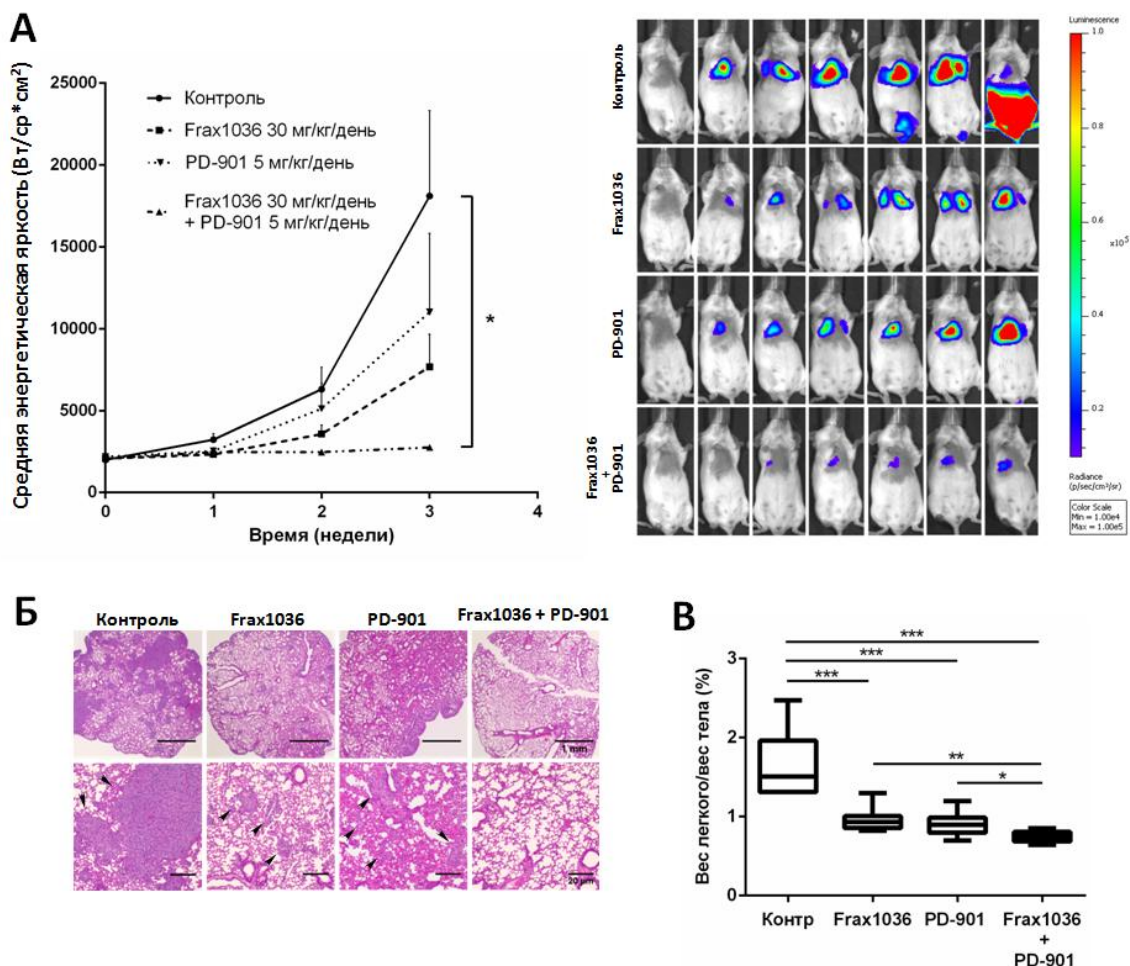
механизмы, ответственные за распространение MPNST остаются неисследованными.

Как было продемонстрировано в Главе 4.1., метастатические MPNST характеризуются повышенным уровнем активности PAK1/2/3, что указывает на возможную роль PAK I группы в метастазировании MPNST и их росте в отдалённых органах. Мы показали, что выключение PAK1/2/3 регулирует молекулярные механизмы, управляющие инвазивным ростом MPNST (Глава 4.3.) и оказывает супрессорный эффект на подвижность клеток MPNST *in vitro* (Глава 4.2.). Эти данные позволяют предположить, что PAK I группы могут представлять собой перспективные мишени для контроля распространения MPNST.

Так как на сегодняшний день не создано модели спонтанных метастазов MPNST *in vivo*, мы использовали ранее описанную модель экспериментальных метастазов [193] с модификациями. Согласно этой модели, внутривенная инъекция (инъекция в хвостовую вену) опухолевых клеток приводит к формированию микроколоний в лёгких [193]. Из доступных нам клеточных линий MPNST была выбрана линия STS26T. В соответствии с опубликованными данными, инъекции только этих клеток в хвостовую вену приводят к формированию экспериментальных лёгочных метастазов [193]. Для отслеживания колонизации лёгких клетками MPNST и роста экспериментальных метастазов в реальном времени клетки STS26T были помечены люциферазой светляка (Luc) (Рис. 33).

Клетки STS26T-Luc вводили в хвостовую вену иммунодефицитным мышам линии SCID. Для того чтобы определить, предотвращает ли Frax1036 колонизацию лёгких клетками MPNST как индивидуальный агент или в комбинации с PD-901, терапию начинали в день инокуляции клеток. Доза ингибитора MEK PD-901 была снижена до 5 мг/кг/день для уменьшения его воздействия на клеточную пролиферацию. Животных

распределяли в 4 группы, которые получали плацебо, Frax1036 (30 мг/кг/день), PD-901 (5 мг/кг/день) или комбинацию Frax1036 (30 мг/кг/день) и PD-901 (5 мг/кг/день) в течение 3 недель. Размеры метастазов оценивали методом биолуминесцентной визуализации (BLI).



**Рисунок 33. Комбинация Frax1036 и PD0325901 ингибирует рост лёгочных метастазов MPNST.**

А) Количественный анализ сигналов BLI в области легких животных в контрольной и экспериментальных группах. Репрезентативные фотографии животных на 21 день после введения клеток STS26-Luc.

Б) Репрезентативные фотографии гистологических срезов лёгких мышей, окрашенных гематоксилином и эозином. Метастазы MPNST показаны стрелками в контроле и образцах, экспонированных Frax1036 и PD-901.

В) Количественный анализ веса легких, нормализованных к весу тела животных в контрольной и экспериментальных группах в конце исследования.

Данные представлены в виде среднего значения и ошибки среднего (\*= $p < 0.05$ , \*\*= $p < 0.01$ , \*\*\*= $p < 0.005$ ).



Анализ данных VLI показал снижение скорости роста опухолей у мышей, получавших Fgax1036 ( $\sim 7677.143$  Вт/ср\*см<sup>2</sup> в конце эксперимента) или PD-901 ( $\sim 11025.71$  Вт/ср\*см<sup>2</sup>), в сравнении с контрольной группой ( $\sim 18112.86$  Вт/ср\*см<sup>2</sup>) (Рис. 33А). У мышей, получавших комбинацию Fgax1036 и PD-901, сигналы VLI оставались сравнимыми с фоновыми сигналами в течение всего эксперимента ( $2760$  Вт/ср\*см<sup>2</sup> против  $2084.64$  Вт/ср\*см<sup>2</sup> в фоне) (Рис. 33А).

В конце эксперимента животных усыпляли и собирали ткани. Вес лёгких, косвенно указывающий на количество и размер метастазов, значительно отличался в контрольной группе ( $\sim 329.7$  мг/ $\sim 1.75\%$  веса тела) и группах, получавших Fgax1036 ( $\sim 195.3$  мг/ $\sim 0.97\%$  веса тела) или PD-901 ( $\sim 196.4$  мг/ $\sim 0.92\%$  веса тела) (Рис. 33В). Вес лёгких у животных, получавших оба препарата, имел нормальные значения ( $\sim 149.4$  мг/ $\sim 0.75\%$  веса тела). Эти наблюдения были подтверждены данными иммуногистохимического исследования (Рис. 33Б). Массивные опухолевые метастазы были обнаружены в 6 из 7 контрольных животных. Метастазы абдоминальных лимфоузлов были обнаружены у 3 мышей в контрольной группе, метастазы яичников – у 1 мыши в контрольной группе. У животных, получавших Fgax1036 или PD-901, были обнаружены опухоли лёгких меньшего размера, а у животных, прошедших сочетанную терапию не было выявлено опухолей.

Итак, мы показали, что ингибитор РАК Fgax1036 подавляет рост экспериментальных лёгочных метастазов MPNST, индуцированных клетками STS26T, и предотвращает формирование метастазов в комбинации с ингибитором MEK PD-901. Как было продемонстрировано выше, уровень фосфо-РАК1/2/3 в клетках STS26T сравним с таковым в нормальных шванновских клетках (Глава 4.1.), и инактивация РАК1/2/3 в клетках STS26T оказывает незначительный эффект в отношении клеточной пролиферации, однако, эффективно ингибирует клеточную

инвазию (Глава 4.2.). Данные экспериментов *in vivo* позволяют предположить, что ингибирование РАК не является достаточным для подавления роста таких МРNST, однако, эффективно предотвращает их распространение. Таким образом, ингибиторы РАК1/2/3 являются перспективными терапевтическими агентами для МРNST высокой степени злокачественности и могут применяться в сочетании с ингибитором МЕК, обладающим выраженным антипролиферативным эффектом.

## 5. Выводы

1. Выявлено увеличение уровня фосфорилирования p21-активируемых киназ I группы (PAK1/2/3) в тканях злокачественных опухолей оболочек периферических нервов (MPNST) по сравнению с таковым в тканях доброкачественных опухолей (нейрофибром) и тканях нормальных периферических нервов человека. Установлено, что высокий уровень фосфо-PAK1/2/3 характерен для метастазов MPNST. Не обнаружено взаимосвязи между уровнем фосфорилирования PAK1/2/3 в опухолях и инактивацией гена *NF1* у пациентов.
2. Показано, что воздействие ингибиторов PAK1/2/3, а также генетический нокдаун *PAK1/2/3* снижают пролиферативную и инвазивную способность клеток MPNST. Обнаружена положительная корреляция между уровнем фосфо-PAK1/2/3 в клетках MPNST и их чувствительностью к инактивации PAK1/2/3.
3. Установлено, что ингибирование PAK1/2/3 и нокдаун кодирующих их генов в клетках MPNST с высоким уровнем фосфо-PAK1/2/3 вызывает снижение активности узловых компонентов сигнальных каскадов PI3K и Wnt, а также снижает уровень N-кадгерина. Подавление фосфорилирования киназы MEK1 по остатку серина 298, опосредованное ингибированием PAK1/2/3, не приводит к инактивации каскада MAPK/ERK *in vitro*.
4. Продемонстрировано, что введение модельным животным ингибитора p21-активируемых киназ I группы Frax1036 замедляет рост подкожных ксенографтных MPNST с высоким уровнем фосфо-PAK1/2/3. Воздействие Frax1036 не влияет на рост подкожных опухолей, индуцированных клетками MPNST с низким уровнем фосфо-PAK1/2/3, однако, вызывает уменьшение среднего совокупного размера лёгочных метастазов, индуцированных этими клетками.

5. Показано, что ингибиторы РАК1/2/3 (Frx1036) и МЕК1/2 (PD0325901) взаимодействуют по синергическому типу и эффективно подавляют рост клеток МРNST при совместном использовании. Сочетанная терапия Frx1036 и PD0325901 в модели подкожных ксенографтных опухолей и в модели экспериментальных лёгочных метастазов МРNST оказывает более выраженный противоопухолевый эффект, чем индивидуальная терапия каждым из ингибиторов.

## 6. Благодарности

Автор благодарит научного руководителя Сергея Михайловича Деева и заведующего лабораторией молекулярной онкологии Джонатана Чернова (Онкологический центр «Фокс Чейз») за помощь в организации и планировании работы, а также в публикации научных статей. Автор выражает благодарность коллективу лаборатории молекулярной иммунологии, в особенности Екатерине Николаевне Лебедеenko, за помощь в оформлении диссертационной работы и создание дружественной атмосферы в лаборатории. Автор очень признателен коллективу лаборатории молекулярной онкологии за сотрудничество. Особую благодарность автор выражает Дине Степановой за поддержку, ценные методические советы и помощь в выполнении экспериментов *in vivo*.

Автор благодарен Александру Лазару (Онкологический центр имени М. Д. Андерсона, США) за предоставленные тканевые микроматрицы, а также всем пациентам и врачам, принимавшим участие в их создании. Автор выражает благодарность Нэнси Рэтнер (Детский госпиталь Цинциннати, США) и Ахмету Хоуку (Университет Джонса Хопкинса, США) за предоставленные клеточные линии.

## 7. Список сокращений

АТ – антитела

АТФ – аденозинтрифосфат

БПВ – беспрогрессивная выживаемость

ГТФ – гуанозинтрифосфат

ГДФ – гуанозиндифосфат

мРНК – матричная РНК

миРНК – малая интерферирующая РНК

миРАК – миРНК против РАК

НМИК – низкомолекулярный ингибитор киназ

НФИ – нейрофиброматоз I типа

ОВ – общая выживаемость

ОО – ответ опухоли

ОТ-ПЦР – ПЦР с обратной транскрипцией

ПААГ – полиакриламидный гель

ПЭТ - полиэтилентерефталат

ПНФ – плексиформные нейрофибромы

ПНС – периферическая нервная система

РТК – рецепторные тирозинкиназы

ЦНС – центральная нервная система

ШК – шванновские клетки

AURKA – aurora kinase A, киназа Аврора А

CI - combination index, комбинационный индекс

CDC42 – cell division cycle 42, ГТФаза митотического цикла 42

CDK4 – cyclin-dependant kinase 4, циклинзависимая киназа 4

CDK6 - cyclin-dependant kinase 6, циклинзависимая киназа 6

CDKN2A - cyclin-dependent kinase inhibitor 2A, ингибитор

циклинзависимой киназы 2A

DAB - 3,3'-Diaminobenzidine, 3,3'-*диаминобензидин*

ER – estrogen receptors, рецепторы эстрогена

erbB2 – v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2, гомолог гена-активатора роста вирусной эритробластической лейкемии

EGFR - epidermal growth factor receptor, рецептор фактора роста эпидермиса

EED - embryonic ectoderm development, белок эмбрионального развития эктодермы

ERK – extracellular signal-regulated kinases, киназы, регулируемые внеклеточной сигнализацией

EGFR - epidermal growth factor receptor, фактор роста эпидермиса

GAP – GTPase activating protein, белок-активатор ГТФазы

GRD – GAP related domain, домен, родственный GAP

GFP – green fluorescent protein, зелёный флуоресцентный белок

GRB2 - Growth factor receptor-bound protein 2, белок, связанный с рецептором ростовых факторов, 2

GST - glutathione-S- transferase, глутатион-S-трансфераза

*FMRI*- fragile X mental retardation 1, ген синдрома хрупкой X-хромосомы 1

*FRX1* – fragile X related 1, ген, связанный с хрупкой X-хромосомой, 1

IRA – inhibitor of Ras, ингибитор Ras

IACUC - Institutional Animal Care and Use Committee, Комитет по содержанию и использованию лабораторных животных

IC<sub>50</sub> – half maximal inhibitory concentration, концентрация полумаксимального ингибирования

K<sub>i</sub> – константа ингибирования

LIMK - LIM domain kinase, киназа, содержащая LIM

МАРК – mitogen-activated protein kinase, митоген-активируемая протеинкиназа

МЕК – MAPK/ERK kinase, киназа MAPK/ERK

MMP - matrix metalloproteinases, матриксные металлопротеиназы

MDM2 - mouse double minute chromosome amplified oncogene, белок-активатор опухолевого роста, амплифицированный на хромосоме типа «double minute»

MPNST – malignant peripheral nerve sheath tumors, - злокачественные опухоли периферических нервов

NF1 – neurofibromin 1, нейрофибромин

*NF1*- ген нейрофибромина человека

*Nf1* – ген нейрофибромина мыши

NCK - non-catalytic region of tyrosine kinase adaptor protein 1, адаптерный белок некаталитического участка тирозинкиназы 1

NRG1 - neuregulin-1, нейрегулин-1

ПАК - p21-activated kinases, p21-активируемые киназы

p16/INK4A - inhibitor of kinase 4 A, ингибитор киназы 4 A

p19/ARF – alternate reading frame protein product of the *CDKN2A* locus, белковый продукт альтернативной рамки считывания гена *CDKN2A*

p21<sup>Cip1</sup> – CDK-interacting protein 1, белок, взаимодействующий с циклинзависимой киназой , 1

PIX - PAK-interacting exchange factor, фактор обмена нуклеотидов, взаимодействующий с ПАК

PDGF - platelet-derived growth factor, фактора роста тромбоцитов

RAC – RAS-related C3 botulinum toxin substrate, родственник антигену крысиной саркомы субстрат ботулинического токсина C3

RAS – rat sarcoma, белок крысиной саркомы

RHO – RAS homolog gene family, семейство гомологов RAS

PI3K – phosphatidylinositol-3-phosphate kinase, киназа фосфатидилинозитола-3-фосфата

PKB/АКТ – proteinkinase B/ v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1, протеинкиназа B/ гомолог онкогена вирусной мышшиной тимомы v-akt,



PRC2 – Polycomb repressive complex 2, репрессорный комплекс белков Polycomb

*PTK2* - protein tyrosine kinase 2 gene (focal adhesion kinase, ФАК), ген протеинтирозинкиназы 2 (киназы фокальных контактов)

PcG - Polycomb-group proteins, белки группы Polycomb

RASSF1A - Ras association domain-containing protein 1, белок, содержащий домен взаимодействия с Ras 1

RAF – v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog, гомолог гена-активатора роста вирусной саркомы мышей

RB - retinoblastoma protein, белок ретинобластомы

*ROCK2*- RHO-associated protein kinase 2, RHO-ассоциированная протеинкиназа 2

SH3 - SRC homology 3, гомолог SRC 3

SUZ12 - suppressor of Zeste 12 homolog, гомолог супрессора Zeste 12

SRC - V-Src Avian Sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) Viral Oncogene Homolog, гомолог вирусного гена-активатора роста саркомы птиц V-Src (Schmidt-Ruppin A-2)

ТМА – tissue microarray, тканевая микроматрица

## 8. Список литературы

1. Evans, D.G., et al., *Malignant peripheral nerve sheath tumours in neurofibromatosis 1*. J Med Genet, 2002. **39**(5): p. 311-4.
2. Trovo-Marqui, A.B. and E.H. Tajara, *Neurofibromin: a general outlook*. Clin Genet, 2006. **70**(1): p. 1-13.
3. Rasmussen, S.A. and J.M. Friedman, *NF1 gene and neurofibromatosis 1*. Am J Epidemiol, 2000. **151**(1): p. 33-40.
4. Kim, A., et al., *Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumors State of the Science: Leveraging Clinical and Biological Insights into Effective Therapies*. Sarcoma, 2017. **2017**: p. 7429697.
5. Carroll, S.L., *The Challenge of Cancer Genomics in Rare Nervous System Neoplasms: Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumors as a Paradigm for Cross-Species Comparative Oncogenomics*. Am J Pathol, 2016. **186**(3): p. 464-77.
6. Watson, A.L., et al., *Canonical Wnt/beta-catenin signaling drives human schwann cell transformation, progression, and tumor maintenance*. Cancer Discov, 2013. **3**(6): p. 674-89.
7. Upadhyaya, M., et al., *Microarray-based copy number analysis of neurofibromatosis type-1 (NF1)-associated malignant peripheral nerve sheath tumors reveals a role for Rho-GTPase pathway genes in NF1 tumorigenesis*. Hum Mutat, 2012. **33**(4): p. 763-76.
8. Brown, L.A., et al., *Amplification of 11q13 in ovarian carcinoma*. Genes Chromosomes Cancer, 2008. **47**(6): p. 481-9.
9. Endo, M., et al., *Prognostic significance of AKT/mTOR and MAPK pathways and antitumor effect of mTOR inhibitor in NF1-related and sporadic malignant peripheral nerve sheath tumors*. Clin Cancer Res, 2013. **19**(2): p. 450-61.

10. Johansson, G., et al., *Effective in vivo targeting of the mammalian target of rapamycin pathway in malignant peripheral nerve sheath tumors*. Mol Cancer Ther, 2008. **7**(5): p. 1237-45.
11. Miller, S.J., et al., *Large-scale molecular comparison of human schwann cells to malignant peripheral nerve sheath tumor cell lines and tissues*. Cancer Res, 2006. **66**(5): p. 2584-91.
12. Johannessen, C.M., et al., *The NF1 tumor suppressor critically regulates TSC2 and mTOR*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(24): p. 8573-8.
13. McDaniel, A.S., et al., *Pak1 regulates multiple c-Kit mediated Ras-MAPK gain-in-function phenotypes in Nf1 +/- mast cells*. Blood, 2008. **112**(12): p. 4646-54.
14. Luscan, A., et al., *The activation of the WNT signaling pathway is a Hallmark in neurofibromatosis type 1 tumorigenesis*. Clin Cancer Res, 2014. **20**(2): p. 358-71.
15. Mo, W., et al., *CXCR4/CXCL12 mediate autocrine cell- cycle progression in NF1-associated malignant peripheral nerve sheath tumors*. Cell, 2013. **152**(5): p. 1077-90.
16. Rahrman, E.P., et al., *Forward genetic screen for malignant peripheral nerve sheath tumor formation identifies new genes and pathways driving tumorigenesis*. Nat Genet, 2013. **45**(7): p. 756-66.
17. Malone, C.F., et al., *Defining key signaling nodes and therapeutic biomarkers in NF1-mutant cancers*. Cancer Discov, 2014. **4**(9): p. 1062-73.
18. Watson, A.L., et al., *Co-targeting the MAPK and PI3K/AKT/mTOR pathways in two genetically engineered mouse models of schwann cell tumors reduces tumor grade and multiplicity*. Oncotarget, 2014. **5**(6): p. 1502-14.
19. Jessen, W.J., et al., *MEK inhibition exhibits efficacy in human and mouse neurofibromatosis tumors*. J Clin Invest, 2013. **123**(1): p. 340-7.

20. Zou, C.Y., et al., *Dual targeting of AKT and mammalian target of rapamycin: a potential therapeutic approach for malignant peripheral nerve sheath tumor*. Mol Cancer Ther, 2009. **8**(5): p. 1157-68.
21. Tang, Y., et al., *A role for Pak protein kinases in Schwann cell transformation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(9): p. 5139-44.
22. Zhao, Z.S. and E. Manser, *PAK family kinases: Physiological roles and regulation*. Cell Logist, 2012. **2**(2): p. 59-68.
23. Radu, M., et al., *PAK signalling during the development and progression of cancer*. Nat Rev Cancer, 2014. **14**(1): p. 13-25.
24. Rudolph, J., et al., *Inhibitors of p21-activated kinases (PAKs)*. J Med Chem, 2015. **58**(1): p. 111-29.
25. Semenova, G. and J. Chernoff, *Targeting PAK1*. Biochem Soc Trans, 2017. **45**(1): p. 79-88.
26. Kumar, R., et al., *Structure, biochemistry, and biology of PAK kinases*. Gene, 2017. **605**: p. 20-31.
27. Arias-Romero, L.E. and J. Chernoff, *A tale of two Paks*. Biol Cell, 2008. **100**(2): p. 97-108.
28. Lei, M., et al., *Structure of PAK1 in an autoinhibited conformation reveals a multistage activation switch*. Cell, 2000. **102**(3): p. 387-97.
29. Jha, R.K. and C.E. Strauss, *3D structure analysis of PAKs: A clue to the rational design for affinity reagents and blockers*. Cell Logist, 2012. **2**(2): p. 69-77.
30. Jaffer, Z.M. and J. Chernoff, *p21-activated kinases: three more join the Pak*. Int J Biochem Cell Biol, 2002. **34**(7): p. 713-7.
31. Pirruccello, M., et al., *A dimeric kinase assembly underlying autophosphorylation in the p21 activated kinases*. Journal of molecular biology, 2006. **361**(2): p. 312-26.
32. Manser, E., et al., *PAK kinases are directly coupled to the PIX family of nucleotide exchange factors*. Mol Cell, 1998. **1**(2): p. 183-92.

33. King, C.C., et al., *p21-activated kinase (PAK1) is phosphorylated and activated by 3-phosphoinositide-dependent kinase-1 (PDK1)*. J Biol Chem, 2000. **275**(52): p. 41201-9.
34. Shin, Y.J., Y.B. Kim, and J.H. Kim, *Protein kinase CK2 phosphorylates and activates p21-activated kinase 1 (PAK1)*. Molecular biology of the cell, 2013.
35. Zhou, G.L., et al., *Akt phosphorylation of serine 21 on Pak1 modulates Nck binding and cell migration*. Molecular and cellular biology, 2003. **23**(22): p. 8058-69.
36. Stochlic, T.I., et al., *Phosphoinositides are essential coactivators for p21-activated kinase 1*. Mol Cell, 2010. **40**(3): p. 493-500.
37. Bokoch, G.M., et al., *A GTPase-independent mechanism of p21-activated kinase activation. Regulation by sphingosine and other biologically active lipids*. J Biol Chem, 1998. **273**(14): p. 8137-44.
38. Baskaran, Y., et al., *Group I and II mammalian PAKs have different modes of activation by Cdc42*. EMBO reports, 2012. **13**(7): p. 653-9.
39. Ching, Y.P., et al., *Identification of an autoinhibitory domain of p21-activated protein kinase 5*. J Biol Chem, 2003. **278**(36): p. 33621-4.
40. Wallace, S.W., et al., *Cdc42 regulates apical junction formation in human bronchial epithelial cells through PAK4 and Par6B*. Mol Biol Cell, 2010. **21**(17): p. 2996-3006.
41. Ha, B.H., et al., *Type II p21-activated kinases (PAKs) are regulated by an autoinhibitory pseudosubstrate*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012. **109**(40): p. 16107-12.
42. Ye, D.Z. and J. Field, *PAK signaling in cancer*. Cell Logist, 2012. **2**(2): p. 105-116.
43. Arias-Romero, L.E. and J. Chernoff, *p21-activated kinases in Erbb2-positive breast cancer: A new therapeutic target?* Small GTPases, 2010. **1**(2): p. 124-128.

44. Balasenthil, S., et al., *p21-activated kinase-1 signaling mediates cyclin D1 expression in mammary epithelial and cancer cells*. J Biol Chem, 2004. **279**(2): p. 1422-8.
45. Beeser, A., et al., *Role of group A p21-activated kinases in activation of extracellular-regulated kinase by growth factors*. J Biol Chem, 2005. **280**(44): p. 36609-15.
46. Wang, Z., et al., *p21-Activated Kinase 1 (PAK1) Can Promote ERK Activation in a Kinase-independent Manner*. J Biol Chem, 2013. **288**(27): p. 20093-9.
47. Higuchi, M., et al., *Scaffolding function of PAK in the PDK1-Akt pathway*. Nat Cell Biol, 2008. **10**(11): p. 1356-64.
48. Arias-Romero, L.E., et al., *Pak1 kinase links ErbB2 to beta-catenin in transformation of breast epithelial cells*. Cancer Res, 2013. **73**(12): p. 3671-82.
49. He, H., et al., *P-21 activated kinase 1 knockdown inhibits beta-catenin signalling and blocks colorectal cancer growth*. Cancer letters, 2012. **317**(1): p. 65-71.
50. He, H., A. Shulkes, and G.S. Baldwin, *PAK1 interacts with beta-catenin and is required for the regulation of the beta-catenin signalling pathway by gastrins*. Biochimica et biophysica acta, 2008. **1783**(10): p. 1943-54.
51. Kobayashi, M., et al., *Nuclear translocation of beta-catenin in colorectal cancer*. Br J Cancer, 2000. **82**(10): p. 1689-93.
52. Geyer, F.C., et al., *beta-Catenin pathway activation in breast cancer is associated with triple-negative phenotype but not with CTNNB1 mutation*. Mod Pathol, 2011. **24**(2): p. 209-31.
53. Kissil, J.L., et al., *Merlin phosphorylation by p21-activated kinase 2 and effects of phosphorylation on merlin localization*. J Biol Chem, 2002. **277**(12): p. 10394-9

54. Shaw, R.J., et al., *The Nf2 tumor suppressor, merlin, functions in Rac-dependent signaling*. Dev Cell, 2001. **1**(1): p. 63-72.
55. Xiao, G.H., et al., *p21-activated kinase links Rac/Cdc42 signaling to merlin*. J Biol Chem, 2002. **277**(2): p. 883-6.
56. Rong, R., et al., *Serine 518 phosphorylation modulates merlin intramolecular association and binding to critical effectors important for NF2 growth suppression*. Oncogene, 2004. **23**(52): p. 8447-54.
57. Shaw, R.J., A.I. McClatchey, and T. Jacks, *Regulation of the neurofibromatosis type 2 tumor suppressor protein, merlin, by adhesion and growth arrest stimuli*. J Biol Chem, 1998. **273**(13): p. 7757-64.
58. Zhao, Z.S., et al., *The GIT-associated kinase PAK targets to the centrosome and regulates Aurora-A*. Mol Cell, 2005. **20**(2): p. 237-49.
59. Maroto, B., et al., *P21-activated kinase is required for mitotic progression and regulates Plk1*. Oncogene, 2008. **27**(36): p. 4900-8.
60. Wang, R.A., et al., *P21-activated kinase-1 phosphorylates and transactivates estrogen receptor-alpha and promotes hyperplasia in mammary epithelium*. EMBO J, 2002. **21**(20): p. 5437-47.
61. Friedland, J.C., et al., *alpha6beta4 integrin activates Rac-dependent p21-activated kinase 1 to drive NF-kappaB-dependent resistance to apoptosis in 3D mammary acini*. Journal of cell science, 2007. **120**(Pt 20): p. 3700-12.
62. Dadke, D., et al., *Activation of p21-activated kinase 1-nuclear factor kappaB signaling by Kaposi's sarcoma-associated herpes virus G protein-coupled receptor during cellular transformation*. Cancer Res, 2003. **63**(24): p. 8837-47.
63. Schurmann, A., et al., *p21-activated kinase 1 phosphorylates the death agonist bad and protects cells from apoptosis*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(2): p. 453-61.

64. Tran, N.H. and J.A. Frost, *Phosphorylation of Raf-1 by p21-activated kinase 1 and Src regulates Raf-1 autoinhibition*. J Biol Chem, 2003. **278**(13): p. 11221-6.
65. Wu, X., et al., *p21 activated kinase 5 activates Raf-1 and targets it to mitochondria*. J Cell Biochem, 2008. **105**(1): p. 167-75.
66. Manser, E., et al., *Expression of constitutively active alpha-PAK reveals effects of the kinase on actin and focal complexes*. Mol Cell Biol, 1997. **17**(3): p. 1129-43.
67. Sells, M.A. and J. Chernoff, *Emerging from the Pak: the p21-activated protein kinase family*. Trends Cell Biol, 1997. **7**(4): p. 162-7.
68. Dummler, B., et al., *Pak protein kinases and their role in cancer*. Cancer metastasis reviews, 2009. **28**(1-2): p. 51-63.
69. Carter, J.H., et al., *Pak-1 expression increases with progression of colorectal carcinomas to metastasis*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(10): p. 3448-56.
70. Stofega, M.R., et al., *Constitutive p21-activated kinase (PAK) activation in breast cancer cells as a result of mislocalization of PAK to focal adhesions*. Mol Biol Cell, 2004. **15**(6): p. 2965-77.
71. Sheetz, M.P., *Cell migration by graded attachment to substrates and contraction*. Semin Cell Biol, 1994. **5**(3): p. 149-55.
72. Edwards, D.C., et al., *Activation of LIM-kinase by Pak1 couples Rac/Cdc42 GTPase signalling to actin cytoskeletal dynamics*. Nat Cell Biol, 1999. **1**(5): p. 253-9.
73. Nayal, A., et al., *Paxillin phosphorylation at Ser273 localizes a GIT1-PIX-PAK complex and regulates adhesion and protrusion dynamics*. J Cell Biol, 2006. **173**(4): p. 587-9.
74. Chew, T.L., et al., *Phosphorylation of non-muscle myosin II regulatory light chain by p21-activated kinase (gamma-PAK)*. J Muscle Res Cell Motil, 1998. **19**(8): p. 839-54.



75. Sipes, N.S., et al., *Cdc42 regulates extracellular matrix remodeling in three dimensions*. J Biol Chem, 2011. **286**(42): p. 36469-77.
76. Rider, L., P. Oladimeji, and M. Diakonova, *PAK1 Regulates Breast Cancer Cell Invasion through Secretion of Matrix Metalloproteinases in Response to Prolactin and Three-Dimensional Collagen IV*. Mol Endocrinol, 2013. **27**(7): p. 1048-64.
77. Goc, A., et al., *Rac1 activation driven by 14-3-3zeta dimerization promotes prostate cancer cell-matrix interactions, motility and transendothelial migration*. PLoS One, 2012. **7**(7): p. e40594.
78. Wang, X.X., et al., *PAK5-Egr1-MMP2 signaling controls the migration and invasion in breast cancer cell*. Tumour Biol, 2013.
79. Kesanakurti, D., et al., *Functional cooperativity by direct interaction between PAK4 and MMP-2 in the regulation of anoikis resistance, migration and invasion in glioma*. Cell Death Dis, 2012. **3**: p. e445.
80. Zhou, L., et al., *Tumor necrosis factor-alpha induced expression of matrix metalloproteinase-9 through p21-activated kinase-1*. BMC Immunol, 2009. **10**: p. 15.
81. Goc, A., et al., *P21 activated kinase-1 (Pak1) promotes prostate tumor growth and microinvasion via inhibition of transforming growth factor beta expression and enhanced matrix metalloproteinase 9 secretion*. J Biol Chem, 2013. **288**(5): p. 3025-35.
82. Aihara, Y., et al., *Induction of neural crest cells from mouse embryonic stem cells in a serum-free monolayer culture*. Int J Dev Biol, 2010. **54**(8-9): p. 1287-94.
83. Zhang, J., P.L. Yang, and N.S. Gray, *Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors*. Nat Rev Cancer, 2009. **9**(1): p. 28-39.
84. Ruegg, U.T. and G.M. Burgess, *Staurosporine, K-252 and UCN-01: potent but nonspecific inhibitors of protein kinases*. Trends Pharmacol Sci, 1989. **10**(6): p. 218-20.

85. Karaman, M.W., et al., *A quantitative analysis of kinase inhibitor selectivity*. Nat Biotechnol, 2008. **26**(1): p. 127-32.
86. Tanramluk, D., et al., *On the origins of enzyme inhibitor selectivity and promiscuity: a case study of protein kinase binding to staurosporine*. Chem Biol Drug Des, 2009. **74**(1): p. 16-24.
87. Maksimoska, J., et al., *Targeting large kinase active site with rigid, bulky octahedral ruthenium complexes*. J Am Chem Soc, 2008. **130**(47): p. 15764-5.
88. Murray, B.W., et al., *Small-molecule p21-activated kinase inhibitor PF-3758309 is a potent inhibitor of oncogenic signaling and tumor growth*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(20): p. 9446-51.
89. Raja, R., et al., *Chronic exposure to cigarette smoke leads to activation of p21 (RAC1)-activated kinase 6 (PAK6) in non-small cell lung cancer cells*. Oncotarget, 2016.
90. Jiang, N., et al., *In vivo quantitative phosphoproteomic profiling identifies novel regulators of castration-resistant prostate cancer growth*. Oncogene, 2015. **34**(21): p. 2764-76.
91. Pitts, T.M., et al., *Association of the epithelial-to-mesenchymal transition phenotype with responsiveness to the p21-activated kinase inhibitor, PF-3758309, in colon cancer models*. Front Pharmacol, 2013. **4**: p. 35.
92. Bradshaw-Pierce, E.L., et al., *Tumor P-Glycoprotein Correlates with Efficacy of PF-3758309 in in vitro and in vivo Models of Colorectal Cancer*. Front Pharmacol, 2013. **4**: p. 22.
93. Chow, H.Y., et al., *p21-Activated kinase 1 is required for efficient tumor formation and progression in a Ras-mediated skin cancer model*. Cancer Res, 2012. **72**(22): p. 5966-75.
94. Licciulli, S., et al., *FRAX597, a small molecule inhibitor of the p21-activated kinases, inhibits tumorigenesis of NF2-associated schwannomas*. J Biol Chem, 2013.

95. Chow, H.Y., et al., *Group I Paks as therapeutic targets in NF2-deficient meningioma*. *Oncotarget*, 2015. **6**(4): p. 1981-94.
96. Dolan, B.M., et al., *Rescue of fragile X syndrome phenotypes in Fmr1 KO mice by the small-molecule PAK inhibitor FRAX486*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013. **110**(14): p. 5671-6.
97. Semenova, G., et al., *Targeting group I p21-activated kinases to control malignant peripheral nerve sheath tumor growth and metastasis*. *Oncogene*, 2017.
98. Prudnikova, T.Y., et al., *Effects of p21-activated kinase 1 inhibition on 11q13-amplified ovarian cancer cells*. *Oncogene*, 2015.
99. Prudnikova, T.Y. and J. Chernoff, *The Group I Pak inhibitor Frax-1036 sensitizes 11q13-amplified ovarian cancer cells to the cytotoxic effects of Rottlerin*. *Small GTPases*, 2016: p. 1-6.
100. Ndubaku, C.O., et al., *Design of Selective PAK1 Inhibitor G-5555: Improving Properties by Employing an Unorthodox Low-pK a Polar Moiety*. *ACS Med Chem Lett*, 2015. **6**(12): p. 1241-6.
101. McCoull, W., et al., *Identification and optimisation of 7-azaindole PAK1 inhibitors with improved potency and kinase selectivity*. *Medchemcomm*, 2014. **5**(10): p. 1533-1539.
102. Deacon, S.W., et al., *An isoform-selective, small-molecule inhibitor targets the autoregulatory mechanism of p21-activated kinase*. *Chem Biol*, 2008. **15**(4): p. 322-31.
103. Viaud, J. and J.R. Peterson, *An allosteric kinase inhibitor binds the p21-activated kinase autoregulatory domain covalently*. *Mol Cancer Ther*, 2009. **8**(9): p. 2559-65.
104. Karpov, A.S., et al., *Optimization of a Dibenzodiazepine Hit to a Potent and Selective Allosteric PAK1 Inhibitor*. *ACS Med Chem Lett*, 2015. **6**(7): p. 776-81.

105. Thullberg, M., et al., *The kinase-inhibitory domain of p21-activated kinase 1 (PAK1) inhibits cell cycle progression independent of PAK1 kinase activity*. *Oncogene*, 2007. **26**(12): p. 1820-8.
106. Say, E., et al., *A functional requirement for PAK1 binding to the KH(2) domain of the fragile X protein-related FXR1*. *Mol Cell*, 2010. **38**(2): p. 236-49.
107. Davidovic, L., et al., *A novel role for the RNA-binding protein FXR1P in myoblasts cell-cycle progression by modulating p21/Cdkn1a/Cip1/Waf1 mRNA stability*. *PLoS Genet*, 2013. **9**(3): p. e1003367.
108. Hashimoto, H., et al., *The direct PAK1 inhibitor, TAT-PAK18, blocks preferentially the growth of human ovarian cancer cell lines in which PAK1 is abnormally activated by autophosphorylation at Thr 423*. *Drug Discov Ther*, 2010. **4**(1): p. 1-4.
109. Kiosses, W.B., et al., *A dominant-negative p65 PAK peptide inhibits angiogenesis*. *Circ Res*, 2002. **90**(6): p. 697-702.
110. Orr, A.W., et al., *Matrix-specific p21-activated kinase activation regulates vascular permeability in atherogenesis*. *J Cell Biol*, 2007. **176**(5): p. 719-27.
111. Yohay, K.H., *The genetic and molecular pathogenesis of NF1 and NF2*. *Semin Pediatr Neurol*, 2006. **13**(1): p. 21-6.
112. Ferner, R.E., *Neurofibromatosis 1*. *Eur J Hum Genet*, 2007. **15**(2): p. 131-8.
113. Lakkis, M.M. and G.I. Tennekoon, *Neurofibromatosis type 1. I. General overview*. *J Neurosci Res*, 2000. **62**(6): p. 755-63.
114. Babovic, S., et al., *Liposuction: a less invasive surgical method of debulking plexiform neurofibromas*. *Dermatol Surg*, 2003. **29**(7): p. 785-7.

115. Nielsen, G.P., et al., *Malignant transformation of neurofibromas in neurofibromatosis 1 is associated with CDKN2A/p16 inactivation*. Am J Pathol, 1999. **155**(6): p. 1879-84.
116. Kourea, H.P., et al., *Expression of p27(kip) and other cell cycle regulators in malignant peripheral nerve sheath tumors and neurofibromas: the emerging role of p27(kip) in malignant transformation of neurofibromas*. Am J Pathol, 1999. **155**(6): p. 1885-91.
117. Bradtmoller, M., et al., *Impaired Pten expression in human malignant peripheral nerve sheath tumours*. PLoS One, 2012. **7**(11): p. e47595.
118. Wise, J.B., S.G. Patel, and J.P. Shah, *Management issues in massive pediatric facial plexiform neurofibroma with neurofibromatosis type 1*. Head Neck, 2002. **24**(2): p. 207-11.
119. Cawthon, R.M., et al., *A major segment of the neurofibromatosis type 1 gene: cDNA sequence, genomic structure, and point mutations*. Cell, 1990. **62**(1): p. 193-201.
120. Li, Y., et al., *Genomic organization of the neurofibromatosis 1 gene (NF1)*. Genomics, 1995. **25**(1): p. 9-18.
121. Barton, B. and K. North, *Social skills of children with neurofibromatosis type 1*. Dev Med Child Neurol, 2004. **46**(8): p. 553-63.
122. Knudson, A.G., Jr., *Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1971. **68**(4): p. 820-3.
123. Jacks, T., et al., *Tumour predisposition in mice heterozygous for a targeted mutation in Nf1*, in Nat Genet. 1994. p. 353-61.
124. Gutmann, D.H., D.L. Wood, and F.S. Collins, *Identification of the neurofibromatosis type 1 gene product*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(21): p. 9658-62.
125. Xu, G.F., et al., *The catalytic domain of the neurofibromatosis type 1 gene product stimulates ras GTPase and complements ira mutants of S. cerevisiae*. Cell, 1990. **63**(4): p. 835-41.

126. Le, L.Q. and L.F. Parada, *Tumor microenvironment and neurofibromatosis type I: connecting the GAPs*. *Oncogene*, 2007. **26**(32): p. 4609-16.
127. Serra, E., et al., *Schwann cells harbor the somatic NF1 mutation in neurofibromas: evidence of two different Schwann cell subpopulations*. *Hum Mol Genet*, 2000. **9**(20): p. 3055-64.
128. Zhu, Y., et al., *Neurofibromas in NF1: Schwann cell origin and role of tumor environment*. *Science*, 2002. **296**(5569): p. 920-2.
129. Rutkowski, J.L., et al., *Genetic and cellular defects contributing to benign tumor formation in neurofibromatosis type 1*. *Hum Mol Genet*, 2000. **9**(7): p. 1059-66.
130. Carroll, S.L., *Molecular mechanisms promoting the pathogenesis of Schwann cell neoplasms*. *Acta Neuropathol*, 2012. **123**(3): p. 321-48.
131. Brossier, N.M., et al., *Classic Ras Proteins Promote Proliferation and Survival via Distinct Phosphoproteome Alterations in Neurofibromin-Null Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumor Cells*. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2015. **74**(6): p. 568-86.
132. Carroll, S.L. and N. Ratner, *How does the Schwann cell lineage form tumors in NF1?* *Glia*, 2008. **56**(14): p. 1590-605.
133. Parada, L.F., C.H. Kwon, and Y. Zhu, *Modeling neurofibromatosis type 1 tumors in the mouse for therapeutic intervention*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 2005. **70**: p. 173-6.
134. Le, L.Q., et al., *Cell of origin and microenvironment contribution for NF1-associated dermal neurofibromas*. *Cell Stem Cell*, 2009. **4**(5): p. 453-63.
135. Pasmant, E., et al., *Relevance of MPNST cell lines as models for NF1 associated-tumors*. *J Neurooncol*, 2013. **114**(3): p. 353-5.

136. Kourea, H.P., et al., *Deletions of the INK4A gene occur in malignant peripheral nerve sheath tumors but not in neurofibromas*. Am J Pathol, 1999. **155**(6): p. 1855-60.
137. Mawrin, C., et al., *Immunohistochemical and molecular analysis of p53, RB, and PTEN in malignant peripheral nerve sheath tumors*. Virchows Arch, 2002. **440**(6): p. 610-5.
138. Mantripragada, K.K., et al., *High-resolution DNA copy number profiling of malignant peripheral nerve sheath tumors using targeted microarray-based comparative genomic hybridization*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(4): p. 1015-24.
139. Gregorian, C., et al., *PTEN dosage is essential for neurofibroma development and malignant transformation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(46): p. 19479-84.
140. Danielsen, S.A., et al., *Methylated RASSF1A in malignant peripheral nerve sheath tumors identifies neurofibromatosis type 1 patients with inferior prognosis*. Neuro Oncol, 2015. **17**(1): p. 63-9.
141. Zhang, M., et al., *Somatic mutations of SUZ12 in malignant peripheral nerve sheath tumors*. Nat Genet, 2014. **46**(11): p. 1170-2.
142. Lee, W., et al., *PRC2 is recurrently inactivated through EED or SUZ12 loss in malignant peripheral nerve sheath tumors*. Nat Genet, 2014. **46**(11): p. 1227-32.
143. De Raedt, T., et al., *PRC2 loss amplifies Ras-driven transcription and confers sensitivity to BRD4-based therapies*. Nature, 2014. **514**(7521): p. 247-51.
144. Di Croce, L. and K. Helin, *Transcriptional regulation by Polycomb group proteins*. Nat Struct Mol Biol, 2013. **20**(10): p. 1147-55.
145. Gupta, G., A. Mammis, and A. Maniker, *Malignant peripheral nerve sheath tumors*. Neurosurg Clin N Am, 2008. **19**(4): p. 533-43, v.

146. Kahn, J., et al., *Radiation therapy in management of sporadic and neurofibromatosis type 1-associated malignant peripheral nerve sheath tumors*. *Front Oncol*, 2014. **4**: p. 324.
147. Widemann, B.C., et al., *Phase II trial of chemotherapy in sporadic and neurofibromatosis type 1 (NF1)-associated high-grade malignant peripheral nerve sheath tumors (MPNSTs)*. *Journal of Clinical Oncology*, 2013. **13**.
148. Polanovski, O.L., E.N. Lebedenko, and S.M. Deyev, *ERBB oncogene proteins as targets for monoclonal antibodies*. *Biochemistry (Mosc)*, 2012. **77**(3): p. 227-45.
149. Albritton, K.H., et al., *Phase II study of erlotinib in metastatic or unresectable malignant peripheral nerve sheath tumors (MPNST)*. *Journal of Clinical Oncology*, 2006. **24**.
150. Li, H., et al., *Epidermal growth factor receptor signaling pathways are associated with tumorigenesis in the Nf1:p53 mouse tumor model*. *Cancer Res*, 2002. **62**(15): p. 4507-13.
151. Chugh, R., et al., *Phase II multicenter trial of imatinib in 10 histologic subtypes of sarcoma using a bayesian hierarchical statistical model*. *J Clin Oncol*, 2009. **27**(19): p. 3148-53.
152. Maki, R.G., et al., *Phase II study of sorafenib in patients with metastatic or recurrent sarcomas*. *J Clin Oncol*, 2009. **27**(19): p. 3133-40.
153. Ambrosini, G., et al., *Sorafenib inhibits growth and mitogen-activated protein kinase signaling in malignant peripheral nerve sheath cells*. *Mol Cancer Ther*, 2008. **7**(4): p. 890-6.
154. Demestre, M., et al., *Imatinib mesylate (Glivec) inhibits Schwann cell viability and reduces the size of human plexiform neurofibroma in a xenograft model*. *J Neurooncol*, 2010. **98**(1): p. 11-9.



155. Holtkamp, N., et al., *Mutation and expression of PDGFRA and KIT in malignant peripheral nerve sheath tumors, and its implications for imatinib sensitivity*. *Carcinogenesis*, 2006. **27**(3): p. 664-71.
156. Widemann, B.C., et al., *Phase I Trial and Pharmacokinetic Study of the Farnesyltransferase Inhibitor Tipifarnib in Children With Refractory Solid Tumors or Neurofibromatosis Type I and Plexiform Neurofibromas*. *Journal of Clinical Oncology*, 2006. **24**: p. 507-516.
157. Robertson, K.A., et al., *Imatinib mesylate for plexiform neurofibromas in patients with neurofibromatosis type 1: a phase 2 trial*. *Lancet Oncol*, 2012. **13**(12): p. 1218-24.
158. Kim, A., et al., *Phase I trial and pharmacokinetic study of sorafenib in children with neurofibromatosis type I and plexiform neurofibromas*. *Pediatr Blood Cancer*, 2013. **60**(3): p. 396-401.
159. Schuetze, S.M., et al., *SARC009: Phase 2 study of dasatinib in patients with previously treated, high-grade, advanced sarcoma*. *Cancer*, 2016. **122**(6): p. 868-74.
160. Dickson, M.A., et al., *Phase II study of MLN8237 (Alisertib) in advanced/metastatic sarcoma*. *Ann Oncol*, 2016. **27**(10): p. 1855-60.
161. Cox, A.D., et al., *Drugging the undruggable RAS: Mission possible?* *Nat Rev Drug Discov*, 2014. **13**(11): p. 828-51.
162. Ahsan, S., Y. Ge, and M.A. Tainsky, *Combinatorial therapeutic targeting of BMP2 and MEK-ERK pathways in NF1-associated malignant peripheral nerve sheath tumors*. *Oncotarget*, 2016. **7**(35): p. 57171-57185.
163. Ki, D.H., et al., *Overexpression of PDGFRA cooperates with loss of NF1 and p53 to accelerate the molecular pathogenesis of malignant peripheral nerve sheath tumors*. *Oncogene*, 2017. **36**(8): p. 1058-1068.
164. Varin, J., et al., *Dual mTORC1/2 inhibition induces anti-proliferative effect in NF1-associated plexiform neurofibroma and malignant*

- peripheral nerve sheath tumor cells*. *Oncotarget*, 2016. **7**(24): p. 35753-35767.
165. Kahn, M., *Can we safely target the WNT pathway?* *Nat Rev Drug Discov*, 2014. **13**(7): p. 513-32.
166. Semenova, G., et al., *Medium throughput biochemical compound screening identifies novel agents for pharmacotherapy of neurofibromatosis type 1*. *Biochimie*, 2017. **135**: p. 1-5.
167. Sorkin, E.M., S.P. Clissold, and R.N. Brogden, *Nifedipine. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic efficacy, in ischaemic heart disease, hypertension and related cardiovascular disorders*. *Drugs*, 1985. **30**(3): p. 182-274.
168. Kiely, M. and P.A. Kiely, *PP2A: The Wolf in Sheep's Clothing?* *Cancers (Basel)*, 2015. **7**(2): p. 648-69.
169. Ingram, D.A., et al., *Hyperactivation of p21(ras) and the hematopoietic-specific Rho GTPase, Rac2, cooperate to alter the proliferation of neurofibromin-deficient mast cells in vivo and in vitro*. *J Exp Med*, 2001. **194**(1): p. 57-69.
170. Yan, J., et al., *Rac1 mediates the osteoclast gains-in-function induced by haploinsufficiency of Nf1*. *Hum Mol Genet*, 2008. **17**(7): p. 936-48.
171. Dasgupta, B., et al., *Glioma formation in neurofibromatosis 1 reflects preferential activation of K-RAS in astrocytes*. *Cancer Res*, 2005. **65**(1): p. 236-45.
172. Chow, H.Y., et al., *p21-Activated kinases are required for transformation in a cell-based model of neurofibromatosis type 2*. *PLoS One*, 2010. **5**(11): p. e13791.
173. Connolly, D.C. and H.H. Hensley, *Xenograft and Transgenic Mouse Models of Epithelial Ovarian Cancer and Non Invasive Imaging Modalities to Monitor Ovarian Tumor Growth In situ -Applications in*

- Evaluating Novel Therapeutic Agents*. Curr Protoc Pharmacol, 2009. **45**: p. 14 12 1-14 12 26.
174. Hirsch, F.R., et al., *Epidermal growth factor receptor in non-small-cell lung carcinomas: correlation between gene copy number and protein expression and impact on prognosis*. J Clin Oncol, 2003. **21**(20): p. 3798-807.
175. Chou, T.C. and P. Talalay, *Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors*. Adv Enzyme Regul, 1984. **22**: p. 27-55.
176. Chong, C., et al., *The mechanism of PAK activation. Autophosphorylation events in both regulatory and kinase domains control activity*. J Biol Chem, 2001. **276**(20): p. 17347-53.
177. Ong, C.C., et al., *Small molecule inhibition of group I p21-activated kinases in breast cancer induces apoptosis and potentiates the activity of microtubule stabilizing agents*. Breast Cancer Res, 2015. **17**: p. 59.
178. Sells, M.A., et al., *Human p21-activated kinase (Pak1) regulates actin organization in mammalian cells*. Curr Biol, 1997. **7**(3): p. 202-10.
179. Slack-Davis, J.K., et al., *PAK1 phosphorylation of MEK1 regulates fibronectin-stimulated MAPK activation*. J Cell Biol, 2003. **162**(2): p. 281-91.
180. King, A.J., et al., *The protein kinase Pak3 positively regulates Raf-1 activity through phosphorylation of serine 338*. Nature, 1998. **396**(6707): p. 180-3.
181. Zang, M., C. Hayne, and Z. Luo, *Interaction between active Pak1 and Raf-1 is necessary for phosphorylation and activation of Raf-1*. J Biol Chem, 2002. **277**(6): p. 4395-405.
182. Jin, S., et al., *p21-activated Kinase 1 (Pak1)-dependent phosphorylation of Raf-1 regulates its mitochondrial localization, phosphorylation of BAD, and Bcl-2 association*. J Biol Chem, 2005. **280**(26): p. 24698-705.

183. Mao, K., et al., *Regulation of Akt/PKB activity by P21-activated kinase in cardiomyocytes*. J Mol Cell Cardiol, 2008. **44**(2): p. 429-34.
184. He, H., et al., *P-21 activated kinase 1 knockdown inhibits beta-catenin signalling and blocks colorectal cancer growth*. Cancer Lett, 2012. **317**(1): p. 65-71.
185. MacDonald, B.T., K. Tamai, and X. He, *Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases*. Dev Cell, 2009. **17**(1): p. 9-26.
186. Barker, N., *The canonical Wnt/beta-catenin signalling pathway*. Methods Mol Biol, 2008. **468**: p. 5-15.
187. Yang, J., et al., *Mesenchymal to epithelial transition in sarcomas*. Eur J Cancer, 2014. **50**(3): p. 593-601.
188. Crawford, A.T., et al., *E-cadherin expression in postnatal Schwann cells is regulated by the cAMP-dependent protein kinase a pathway*. Glia, 2008. **56**(15): p. 1637-47.
189. Brown, A.P., et al., *Pharmacodynamic and toxicokinetic evaluation of the novel MEK inhibitor, PD0325901, in the rat following oral and intravenous administration*. Cancer Chemother Pharmacol, 2007. **59**(5): p. 671-9.
190. LoRusso, P.M., et al., *Phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of the oral MAPK/ERK kinase inhibitor PD-0325901 in patients with advanced cancers*. Clin Cancer Res, 2010. **16**(6): p. 1924-37.
191. Bain, J., et al., *The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update*. Biochem J, 2007. **408**(3): p. 297-315.
192. Haura, E.B., et al., *A phase II study of PD-0325901, an oral MEK inhibitor, in previously treated patients with advanced non-small cell lung cancer*. Clin Cancer Res, 2010. **16**(8): p. 2450-7.
193. Torres, K.E., et al., *Activated MET is a molecular prognosticator and potential therapeutic target for malignant peripheral nerve sheath tumors*. Clin Cancer Res, 2011. **17**(12): p. 3943-55.