

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки

ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ

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

Российской академии наук

на правах рукописи

Павлюков Марат Самвелович

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

Специальность 03.01.03 – Молекулярная биология

Диссертация на соискание учёной степени

доктора биологических наук

Москва – 2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	4
1. ВВЕДЕНИЕ.....	7
2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	9
2.1. Внутриклеточные механизмы запрограммированной клеточной гибели.....	9
2.1.1. Каспазнезависимый путь апоптоза.....	13
2.1.2. Каспаззависимый путь апоптоза.....	21
2.1.3. Активные формы кислорода при апоптозе.....	34
2.1.4. Роль трансглутаминазы-2 при апоптозе.....	36
2.2. Роль апоптоза в межклеточной коммуникации.....	42
2.2.1. Роль апоптоза в коммуникации нормальных клеток.....	42
2.2.2. Роль апоптоза в коммуникации опухолевых клеток.....	46
2.3. Глиобластома.....	48
2.3.1. Клинические особенности глиобластомы.....	48
2.3.2. Классификация глиобластом.....	53
2.3.3. Эволюция глиобластомы.....	56
2.3.4. Роль внеклеточных везикул в глиобластомах.....	58
3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	61
3.1. Материалы.....	61
3.1.1. Оборудование.....	61
3.1.2. Расходные материалы.....	62
3.1.3. Основные реактивы и компьютерные программы.....	62
3.1.4. Буферные растворы.....	68
3.1.5. Микробиологические среды.....	70
3.1.6. Среда для культивирования эукариотических клеток.....	70
3.2. Методы.....	71
3.2.1. Методы работы с ДНК.....	71
3.2.2. Методы работы с РНК.....	75
3.2.3. Методы работы с бактериями.....	76
3.2.4. Методы работы с белками.....	78
3.2.5. Методы оценки эффективности низкомолекулярных ингибиторов <i>in vitro</i>	84
3.2.6. Методы работы с эукариотическими клетками.....	85
3.2.7. Методы работы с внеклеточными везикулами.....	97
3.2.8. Методы работы с тканями.....	100
3.2.9. Методы работы с животными.....	103

3.2.10. Компьютерные методы анализа данных.....	104
4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	107
4.1. Исследование молекулярного механизма действия белков-ингибиторов апоптоза в опухолевых клетках.....	107
4.1.1. Изучение ингибиторов каспазнезависимого апоптоза.....	107
4.1.2. Изучение ингибиторов каспаззависимого апоптоза.....	114
4.1.3. Изучение ингибитора активных форм кислорода Параоксоназы 2.....	120
4.1.4. Изучение Трансглутаминазы 2 - ингибитора активированной формы каспазы-3.....	126
4.2. Исследование роли апоптоза в эволюции злокачественных опухолей.....	131
4.2.1. Изучение межклеточных сигналов, продуцируемых клетками рака яичников после сеансов химиотерапии.....	131
4.2.2. Изучение межклеточных сигналов, продуцируемых клетками глиобластомы после сеансов химио- и радиотерапии.....	136
4.2.3. Изучение роли <i>proEVs</i> в эволюции глиобластомы.....	147
4.2.4. Исследование молекулярного механизма действия <i>proEVs</i> на клетки глиобластомы.....	157
4.3. Создание новых препаратов, направленно убивающих наиболее агрессивные популяции клеток глиобластомы.....	173
4.3.1. Создание низкомолекулярного ингибитора киназы <i>NEK2</i>	174
4.3.2. Создание низкомолекулярного ингибитора белка <i>Survivin</i>	180
4.3.3. Создание низкомолекулярного ингибитора альдегид дегидрогеназы <i>ALDH1A3</i>	185
4.4. Разработка метода для оценки концентрации и распределения низкомолекулярных соединений внутри клеток глиобластомы.....	188
4.4.1. Применение <i>TOF-SIMS</i> для анализа единичных клеток глиобластомы.....	189
4.4.2. Применение <i>TOF-SIMS</i> для анализа опухолевой ткани глиобластомы.....	192
5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	199
6. ВЫВОДЫ.....	201
7. СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	202
БЛАГОДАРНОСТИ.....	219

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

2-DG – 2-Deoxy-D-glucose
2-HG – 2-Hydroxyglutarate
ADP – Adenosine diphosphate
AIF – Apoptosis Inducing Factor
apoEVs – Extracellular vesicles produced by apoptotic cells
ATP – Adenosine triphosphate
bFGF – Basic Fibroblast Growth Factor
BiFC – Bimolecular fluorescence complementation
BPA – N-(5-Aminopentyl)biotinamide
CFP – Cyan fluorescent protein
CP – Cisplatin
CPC – Chromosomal Passenger Complex
DMSO – Dimethyl sulfoxide
dNTP – Deoxynucleotide triphosphate
ECAR – Extracellular acidification rate
EGF – Epidermal growth factor
EVs – Extracellular vesicles
FBS – Fetal bovine serum
FISH – Fluorescence in situ hybridization
FPKM – Fragments Per Kilobase Million
GBM – Glioblastoma multiforme
GFP – Green fluorescent protein
GSC – Glioma stem cells
GSEA – Gene Set Enrichment Analysis
GTP – Guanosine triphosphate
Hsp – Heat shock protein
IAP – Inhibitor of Apoptosis Protein
IBM – Iap Binding Motif
IC₅₀ – Half maximal inhibitory concentration
IDH – Isocitrate dehydrogenase
IR – Irradiation
K_d – Dissociation constant
LC-MS/MS – Liquid chromatography-tandem mass spectrometry
MALDI-TOF – Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometer

MES – Mesenchymal cells
MTS – Mitochondrial targeting sequence
N/A – Not applicable/ not available
NES – Nuclear export sequence
NLS – Nuclear localisation sequence
NMD – Nonsense-mediated decay
NTA – Nanoparticle tracking analysis
OCR – Oxygen consumption rate
PAR – Poly(ADP-ribose)
PBS – Phosphate buffered saline
PCA – Principal component analysis
PLA – Proximity ligation assay
PN – Proneural cells
PON2 – Paraoxonase 2
qRT-PCR – Reverse transcription quantitative polymerase chain reaction
RFP – Red fluorescent protein
RIP – RNA immunoprecipitation
ROS – Reactive oxygen species
SILAC – Stable Isotope Labeling by/with Amino acids in Cell culture
STR – Short tandem repeat
STS – Staurosporine
TCGA – The Cancer Genome Atlas
TGM2 – Transglutaminase 2
TMZ – Temozolomide
TOF-SIMS – Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry
VEGF – Vascular endothelial growth factor
YFP – Yellow fluorescent protein
zVAD(OMe)fmk – Z-Val-Ala-Asp(OMe)-fluoromethyl ketone
а.к. – Аминокислота
В – Воль
ВММ – Внутренняя мембрана митохондрий
г. – Грамм
Гр. – Грэй
ДНК – Дезоксирибонуклеиновая кислота
ед. – Единица

ИФА – Иммуноферментный анализ
к.б. – Тысяча пар оснований ДНК
кДа – Килодальтон
кДНК – комплементарная ДНК
М – Моль на литр
мА – Миллиампер
мин. – Минута
мкг. – Микрограмм
мл. – Миллилитр
мМ – микромоль на литр
МПМ – Межмембранное пространство митохондрий
мРНК – Матричная РНК
МРТ – Магниторезонансная томография
нг. – Нанограмм
нм. – Нанометр
нМ. – Наномоль на литр
НММ – наружная мембрана митохондрий
п.н. – Пар нуклеотидов
пре-мРНК – предшественник матричной РНК
ПЦР – Полимеразная цепная реакция
РНК – Рибонуклеиновая кислота
сек. – Секунда
ЭПР – Эндоплазматический ретикулум
ЯМР – Ядерный магнитный резонанс

1. ВВЕДЕНИЕ

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

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

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

На сегодняшний день не вызывает сомнений, что раковые опухоли представляют собой сложную тканеподобную систему, постоянно изменяющуюся во времени. Механизмы эволюции злокачественных новообразований исследованы крайне мало, однако, именно они лежат в основе возникновения резистентности к терапии. Последние данные свидетельствуют в пользу того, что один из механизмов эволюции опухолей основан на сигналах, продуцируемых апоптотическими клетками. Так, было показано, что гибнущие под действием терапии раковые клетки секретуют

молекулы, вызывающие изменение фенотипа соседних, выживших, опухолевых клеток и повышающие их устойчивость к разнообразным методам лечения. Ингибирование этих сигналов могло бы существенно увеличить эффективность стандартных методов химио- и радиотерапии.

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

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

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

2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

2.1. Внутриклеточные механизмы запрограммированной клеточной гибели.

Феномен запрограммированной клеточной гибели был описан в 1972 году [1] и 30 лет спустя данное открытие было удостоено Нобелевской премии по физиологии или медицине. Биологический смысл этого процесса заключается в том, чтобы смерть клеток происходила полезным (или наименее вредным) для организма способом. Для того чтобы добиться этой цели, в ходе эволюции возникли сложные механизмы, контролирующие каждый этап гибели клеток многоклеточного организма. До 2000х годов все виды запрограммированной клеточной смерти называли общим термином «апоптоз», однако за последние годы классификация сильно усложнилась, и в соответствии с рекомендациями номенклатурного комитета, изданными в 2018ом году, в настоящий момент выделяют по меньшей мере 12 типов запрограммированной клеточной гибели (**Рис.1**) [2]. К этим типам относятся:

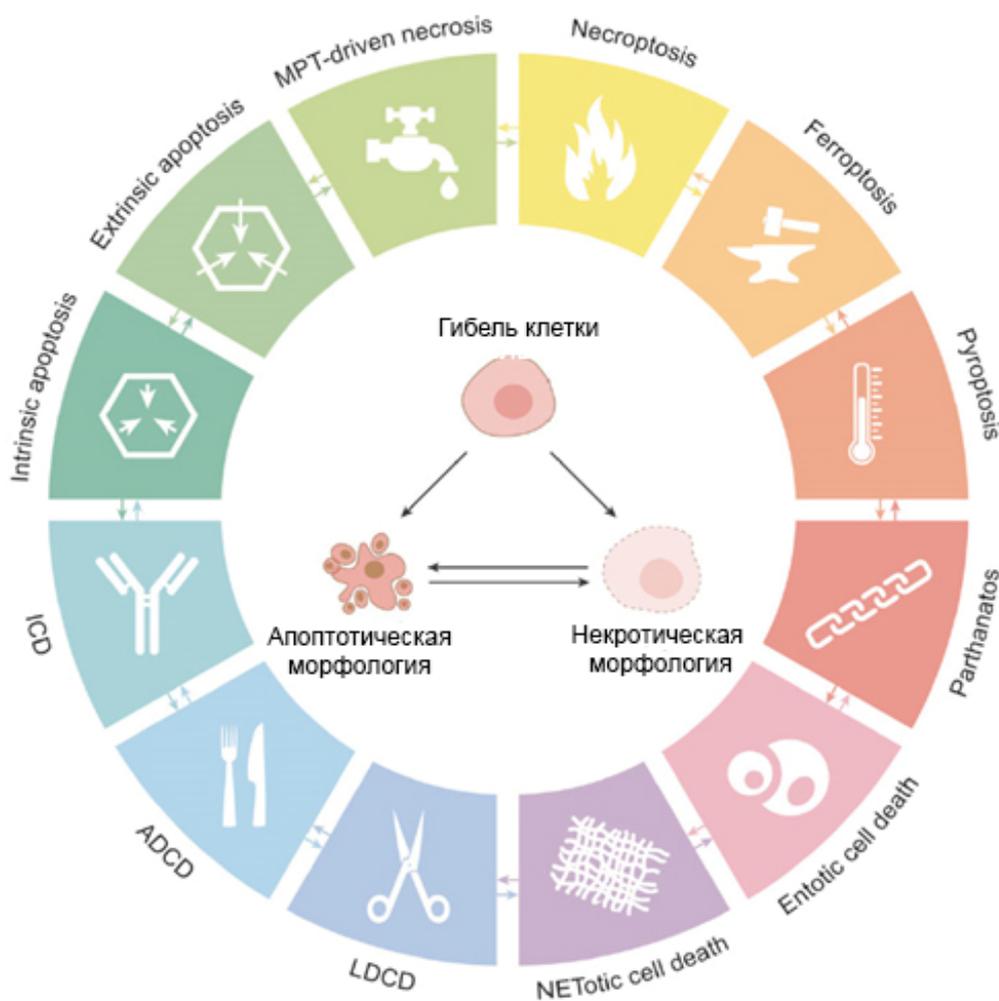


Рисунок 1. Схематическое изображение различных видов запрограммированной клеточной гибели [2].

1) **Некроз, вызванный изменением проницаемости митохондрий** (Mitochondrial permeability transition necrosis) – запускается при сильном окислительном стрессе или перегрузке цитоплазмы ионами Ca^{2+} . Его отличительной особенностью является пермиабилитация внутренней митохондриальной мембраны (ВММ) и быстрая потеря митохондриями мембранного потенциала. Этот тип запрограммированной гибели сопровождается некротической морфологией клеток.

2) **Ферроптоз** (Ferroptosis) – запускается при сильном окислении липидов. Его обязательным условием является повышение концентрации ионов железа в цитоплазме, которое может происходить вследствие разрушения ферритина. Этот тип запрограммированной гибели сопровождается некротической морфологией клеток (**Рис. 2А**).

3) **Некроптоз** (Necroptosis) – запускается рецепторами смерти на наружной клеточной мембране или рецепторами узнавания патогенов, расположенными как на мембране, так и в цитоплазме. Он играет важную роль в защите от вирусов, ингибирующего каспазозависимый путь апоптоза. Ключевую роль в некроптозе выполняют белки MLKL, RIPK1 и RIPK3. Этот тип запрограммированной гибели сопровождается некротической морфологией клеток (**Рис. 2Б**).

4) **Смерть нейтрофилов с образованием внеклеточных ловушек** (NETotic cell death; neutrophil extracellular traps cell death) - происходит в иммунных клетках как часть борьбы с патогенами. Запускается в нейтрофилах, а также в других типах иммунных клеток при активации мембранных рецепторов. Результатом этого пути клеточной гибели является выброс «сети» из хроматина, гистонов и налипших на них клеточных белков. Такие «сети» позволяют «ловить» бактерии, а также играют патогенную роль при развитии диабета и рака (**Рис. 2В**).

5) **Иммуногенная гибель клеток** (ICD; immunogenic cell death) – данная форма клеточной смерти активируется вирусами, а также некоторыми специфическими химическими соединениями. При этом происходит экспонирование на наружную мембрану погибающей клетки разнообразных белков, являющихся «съешь меня» («eat me») сигналами. Помимо этого, на поверхности клетки появляются белки теплового шока и другие молекулы, презентующие антигены для дендритных клеток и Т-клеток. Очень важно отметить, что назначение этого пути клеточной гибели заключается в стимулировании иммунной системы, тогда как классические типы апоптоза, напротив, должны минимизировать активацию иммунных клеток. По этой причине иммуногенная гибель клеток ингибируется белками участниками апоптоза, в первую очередь каспазами (**Рис. 2Г**).

6) **Пироптоз** (Pyroptosis) – происходит в иммунных клетках как часть борьбы с патогенами. Его основными инициаторами являются бактериальные липополисахариды в цитоплазме. Пироптоз позволяет организму бороться с внутриклеточными паразитами и

индуцировать массивный иммунный ответ при обнаружении таких патогенов. При реализации этого пути клеточной гибели наблюдается активация каспазы-1, конденсация хроматина и апоптотическая морфология клеток (**Рис. 2Д**).

7) **Лизосом-зависимая гибель клеток** (LDCD; lysosome-dependent cell death) – эта форма клеточной гибели происходит при воспалении, ремоделировании тканей, старении, нейродегенерации, сердечно-сосудистых заболеваниях и как ответ на внутриклеточные патогены. В данном случае происходит пермеабиллизация мембраны лизосом и попадание лизосомных протеаз и других ферментов в цитоплазму. Эти протеазы вызывают активацию каспаз и расщепление клеточных белков, что в большинстве случаев вызывает апоптотическую морфологию погибающей клетки.

8) **Гибель клеток, зависящая от аутофагии** (ADCDC; autophagy-dependent cell death) – в обычном случае процесс аутофагии призван защитить клетку от гибели в условиях недостаточного количества питательных веществ, однако при некоторых обстоятельствах аутофагия может сама стать причиной смерти клетки. При аутофагии происходит *de novo* образование двумембранных везикул – аутофагосом, которые вначале заключают в себя участок цитоплазмы, а затем переваривают его, сливаясь с лизосомами. Этот вид клеточной гибели наблюдается при развитии некоторых органов, а также во время различных типов ишемических повреждений тканей взрослого организма. В результате происходит уничтожение почти всех клеточных органелл и превращение цитоплазмы клетки в большое количество двумембранных везикул, переваривших своё содержимое [3] (**Рис. 2Е**).

9) **Энтозис** (Entosis) – форма клеточного каннибализма, наблюдаемая как в нормальных, так и в опухолевых тканях. При этом происходит захватывание одной живой клетки внутрь другой клетки. Этот процесс в большинстве случаев запускается при откреплении эпителиальных клеток от внеклеточного матрикса или при нарушении митоза опухолевых клеток. Интересно, что поглощённая клетка уничтожает саму себя с помощью механизма сходного с аутофагией, и только после этого оставшиеся компоненты этой клетки перевариваются с помощью лизосом клетки хозяина (**Рис. 2Ж**).

10) **Партанатос** (Parthanatos) – происходит при гиперактивации систем ответа клетки на повреждение ДНК. Его отличительной особенностью является появление поли-АДФ-рибозы и диссоциация белка AIF от митохондриальной мембраны. При этом типе клеточной гибели наблюдается расщепление ДНК на фрагменты около 50 к.б. и апоптотическая морфология клеток.

11) **Внутренний путь апоптоза** (Intrinsic apoptosis) – индуцируется внутренними стимулами, такими как повреждение ДНК, стресс эндоплазматического ретикулума, нарушение

репликации ДНК, нарушение микротрубочек, митотические дефекты и др. Его отличительной особенностью является сохранение целостности цитоплазматической мембраны и пермиабиллизация наружной мембраны митохондрий (НММ), сопровождаемая выходом проапоптотных белков из межмембранного пространства митохондрий (МПМ). При данном пути клеточной гибели происходит активация каспазы-9, которая в свою очередь активирует эффекторные каспазы-3 и -7 (Рис. 23 и 2И).

12) **Внешний путь апоптоза** (Extrinsic apoptosis) – индуцируется рецепторами на наружной клеточной мембране. К таким рецепторам относятся рецепторы смерти, запускающие апоптоз при взаимодействии со своими лигандами, и рецепторы зависимости, запускающие апоптоз при отсутствии соответствующих лигандов. В данном пути клеточной гибели происходит активация каспазы-8 и последующая активация каспаз-3 и -7 (Рис. 23 и 2И).

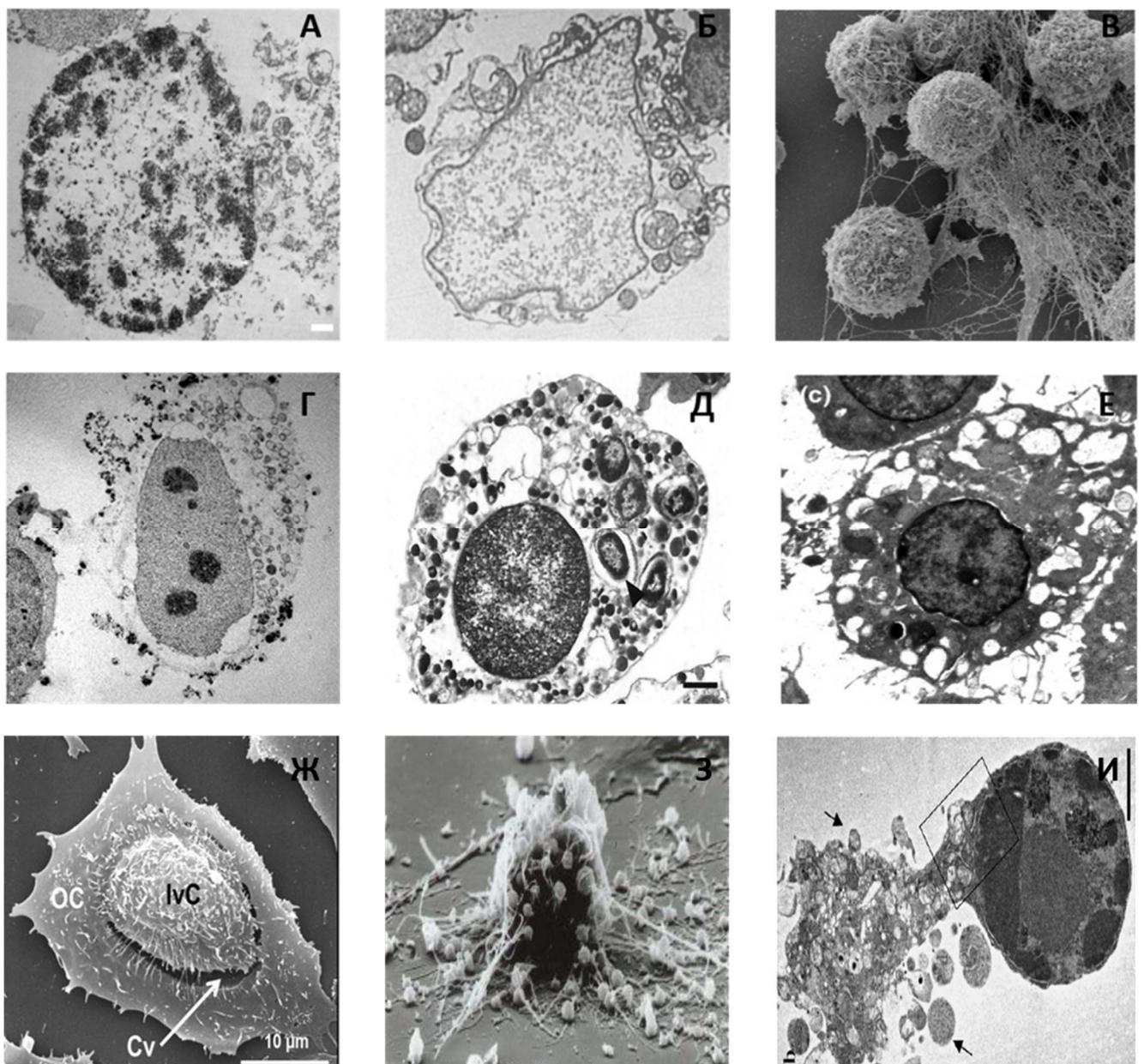


Рисунок 2. Электронные микрофотографии клеток, подвергающихся различным типам запрограммированной клеточной гибели: А – ферроптоз клетки, обработанной геминном [4], Б – некроптоз [5], В - смерть нейтрофилов с образованием внеклеточных ловушек [6], Г - иммуногенная гибель клетки [7], Д – пироптоз клетки, инфицированной *Pseudomonas aeruginosa*, бактерия в цитоплазме обозначена стрелкой [8], Е - гибель клетки, вызванная аутофагией [9], Ж – энтозис [10], З и И – апоптоз [11].

Все перечисленные типы виды клеточной смерти тесно связаны друг с другом и в большинстве случаев протекают параллельно. Их можно представить, как спектр вариантов, расположенных между некрозом (незапрограммированное физическое разрушение структуры клетки) и апоптозом (чётко контролируемое последовательное разрушением клеточных белков и ДНК, приводящее к фрагментации клетки на небольшие мембранные везикулы- апоптотические тельца) (**Рис. 3**). Более того, для изучения одного конкретного вида клеточной гибели учёным часто приходится использовать химические ингибиторы или нокдаун генов, позволяющий отключить другие пути запрограммированной смерти, которые в противном случае протекали бы параллельно с исследуемым типом гибели.

В данной работе мы не рассматриваем типы клеточной гибели, связанные с иммунным ответом, а также наблюдаемые в редких случаях при обработке клеток специфическими соединениями, или при заражении клеток вирусами или бактериями. Цель нашего исследования заключается в изучении роли запрограммированной клеточной гибели в прогрессии злокачественных опухолей. В особенности мы сосредоточим наше внимание на гибели клеток, вызванной противораковыми препаратами. Так как стандартные методы противоопухолевой терапии, используемые для лечения рака яичника, глиобластомы, а также подавляющего большинства других типов опухолей, вызывают повреждение ДНК в клетках мишенях, то далее мы будем рассматривать лишь внутренний путь апоптоза (каспаззависимый апоптоз) и партанатос (каспазнезависимый апоптоз).

2.1.1. Каспазнезависимый путь апоптоза.

Несмотря на большое разнообразие путей апоптоза, все они имеют одинаковую принципиальную схему. В начале каждого из них стоят белки-сенсоры, задача которых заключается в восприятии сигнала клеточной гибели. Далее следует большое количество разнообразных про- и антиапоптозных белков, которые вместе играют роль интеграторов и дают возможность клетке отличить слабые негативные воздействия от сильных. Так, например,

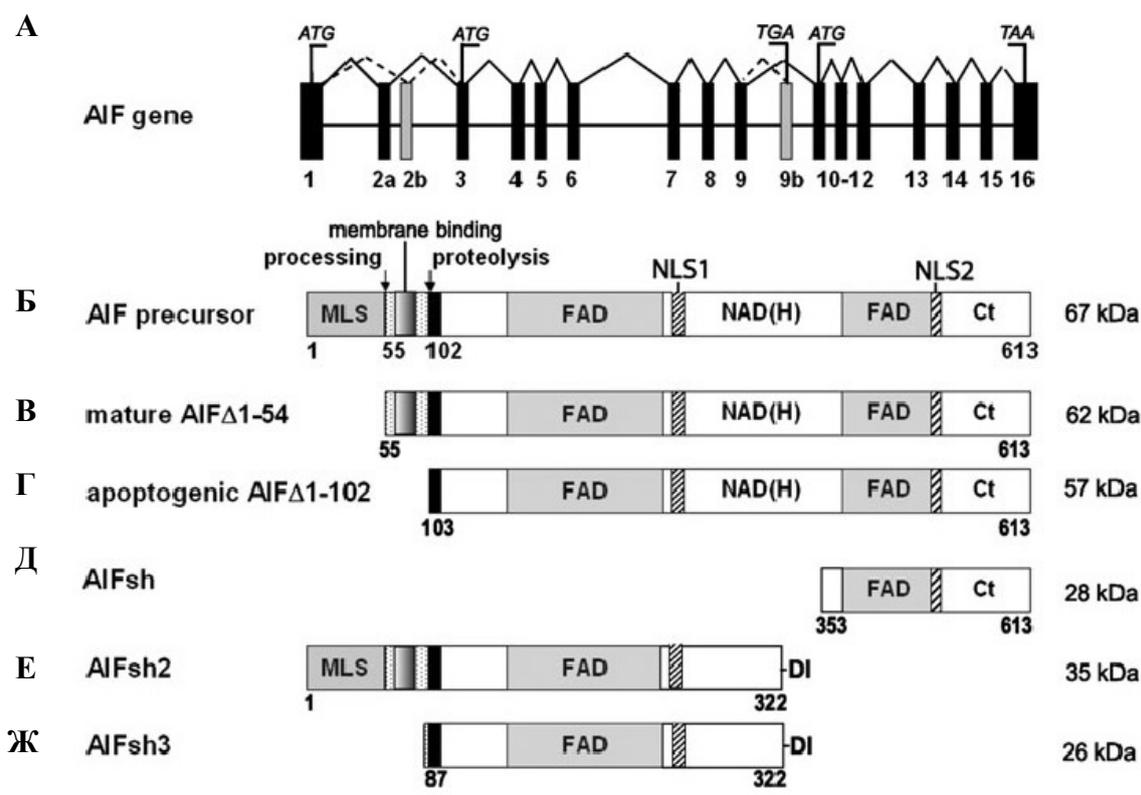
благодаря этим белкам при слабых повреждениях ДНК в клетке активируются системы репарации и ингибируется апоптоз, если же повреждение ДНК оказалось достаточно сильным, то, напротив, происходит ингибирование репарации и активация путей апоптоза. В конце каждого из апоптозных каскадов стоят белки эффекторы, задача которых заключается в непосредственном разрушении клетки. На протяжении многих лет считалось, что белками эффекторами апоптоза являются только каспазы - крайне высокоспецифичные цистеиновые протеазы, субстратами для которых служат белки межклеточных контактов, белки цитоскелета, ферменты репарации ДНК, а также другие жизненно важные для клетки белки. Однако последние открытия показали, что существует и каспазезасимый путь апоптоза (партанатос), который в некоторых случаях имеет гораздо большее значение, чем классические, связанные с каспазами, типы апоптоза.

Главную роль в каспазезависимом апоптозе играет белок AIF (Apoptosis Inducing Factor), индуцирующий фрагментацию ДНК [12]. Сравнительный анализ геномов различных организмов показал, что AIF необычайно консервативен, и его близкие гомологи имеются у всех многоклеточных организмов, включая растения. Таким образом, можно предположить, что путь апоптоза, опосредованный белком AIF, является наиболее древним с точки зрения эволюции [13].

Особый интерес исследование AIF-индуцированной клеточной гибели представляет для онкологии. Дело в том, что многие виды рака обладают высокой устойчивостью к классическому каспазависимому пути клеточной гибели, вследствие делеции генов белков, участвующих в этом процессе. Однако исследования показали, что почти все опухоли высоко чувствительны к апоптозу, опосредованному AIF [14, 15]. Такой результат объясняется тем, что помимо апоптоза AIF жизненно необходим для функционирования митохондрий, и поэтому любые опухолевые клетки содержат значительное количество данного белка, что делает его привлекательной мишенью для разработки новых противоопухолевых препаратов [16]. С другой стороны, AIF играет ключевую роль в ишемических повреждениях здоровых клеток. Недавние работы показали, что гибель мышечных и нервных клеток при инфарктах [17] и инсультах [18] происходит исключительно посредством каспазезависимого AIF-индуцируемого апоптоза, тогда как ингибирование активности AIF перед моделированием инфаркта эффективно предотвращает гибель клеток, позволяя полностью восстановить функциональность сердца через 2 недели после первоначального повреждения [17].

Белок AIF представляет собой NAD-связывающий флавопротеин, кодируемый геном *AIFM1*, расположенном в локусе q25–26 X хромосомы (Рис. 3А) [19]. Основным продуктом этого гена является 67кДа пре-про-пептид, состоящий из 613 аминокислотных остатков (fAIF). На его N-конце находится сигнал митохондриальной локализации (1-30 а.к.) и гидрофобный

трансмембранный сегмент (66-84 а.о.), далее расположены две последовательности ядерного импорта, а также FAD- и NAD-связывающие домены [20]. После синтеза в цитоплазме AIF встраивается во внутреннюю мембрану митохондрий, таким образом, что его N-концевой участок с 1-67 а.к. оказывается в матрице митохондрии, участок 67-83 а.к. располагается непосредственно во внутренней митохондриальной мембране, а С-конец белка остаётся в межмембранном пространстве (**Рис. 3Б**). Далее, под воздействием митохондриальных пептидаз происходит протеолитическое отщепление N-терминальной последовательности с образованием митохондриального AIF $\Delta 1-54$ с массой 62кДа [21] (**Рис. 3В**).



З

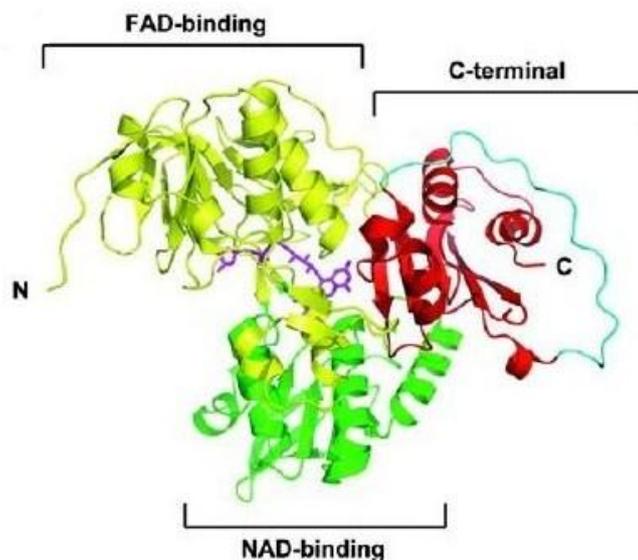


Рисунок 3. Варианты AIF. А - Схема гена AIF у человека. AIF состоит из 16 экзонов и 15 интронов, серым цветом обозначены экзоны, дающие сплайс-варианты, отмечены иницирующий кодон (ATG) и стоп-кодоны (TGA/TAA). Б, Д, Е, Ж - Схематические диаграммы предшественника и сплайс-форм AIF. Обозначены участки MLS, NLS1, NLS2, домены FAD и NAD(H). В - Зрелая форма AIF. Г - Апоптотный AIF. З - Структура зрелого белка AIF. Обозначены FAD- и NAD-связывающие и С-концевой домены [22].

В зависимости от типа сплайсинга альтернативных экзонов (2а и 2б) из пре-мРНК, кодирующей AIF, возможно образование изоформ AIF1 и AIF2. Важно отметить, что экзон 2а присутствует в наиболее распространенном сплайс-варианте (AIF1). Отличие между AIF1 и AIF2 заключается в наличии у AIF2 короткого N-концевого участка, который отрезается в ходе процессинга этого белка. Таким образом, альтернативное использование экзона 2 никак не влияет на митохондриальный транспорт AIF [23]. Кроме того, существуют данные о наличии дополнительных изоформ AIFsh, AIFsh2, AIFsh3 (**Рис. 3Д, Е, Ж**). AIFsh возникает при использовании альтернативного сайта инициации транскрипции, находящегося в интроне 9. В AIFsh отсутствует сигнал митохондриальной локализации (MTS), но присутствуют домены ядерного импорта (NLS), поэтому AIFsh может транслоцироваться в ядро и вызывать апоптоз. AIFsh2 и AIFsh3, в свою очередь, образуются при альтернативном использовании экзона 9б. Эти изоформы характеризуются отсутствием сигнала ядерного импорта и не способны к перемещению в ядро, и, как следствие, не могут индуцировать апоптоз [24].

Длительные исследования белка AIF показали, что его функции контролируются процессами окисления и восстановления кофермента FAD, находящегося в его составе. AIF с окисленным FAD находится в форме мономера, тогда как AIF с восстановленным FAD представляет собой димер (**Рис. 4**) [25]. При этом мономер AIF, взаимодействуя с кофактором NADH, образует устойчивый димерный комплекс CTC (FADH₂-NAD charge-transfer complex). Формирование этого комплекса, в свою очередь, приводит к структурным изменениям участка AIF 509-559 а.к., который содержит Лизин 510 и Лизин 518, необходимые для взаимодействия AIF с ДНК и индукции апоптоза, а также последовательность PEST, предположительно участвующую в протеолизе AIF. Кроме того, мономер-димерный переход влияет на доступность NLS, что определяет, сможет ли AIF переместиться в ядро и вызвать апоптоз. В комплексе CTC последовательность NLS становится частью поверхности димеризации, и, по этой причине, CTC не может транспортироваться в ядро, в то время как в мономере эта последовательность открыта (**Рис. 4**). Таким образом, можно сказать, что способность AIF индуцировать апоптоз и

взаимодействовать с другими белками регулируется конформационными изменениями AIF, возникающими при взаимодействии с кофактором NADH.

В ходе апоптоза происходит диссоциация AIF от митохондриальной мембраны и его перемещение в цитоплазму, а затем в ядро клетки. Необычна кинетика этого процесса. Многими авторами было показано, что транслокация AIF происходит через 12-18 часов после индукции апоптоза и является следствием активации классического, управляемого каспазами, пути запрограммированной клеточной гибели [26]. Напротив, работы других групп демонстрировали, что перемещение AIF происходит уже через 10-20 минут после индукции апоптоза и намного опережает активацию каспаззависимого пути [27].

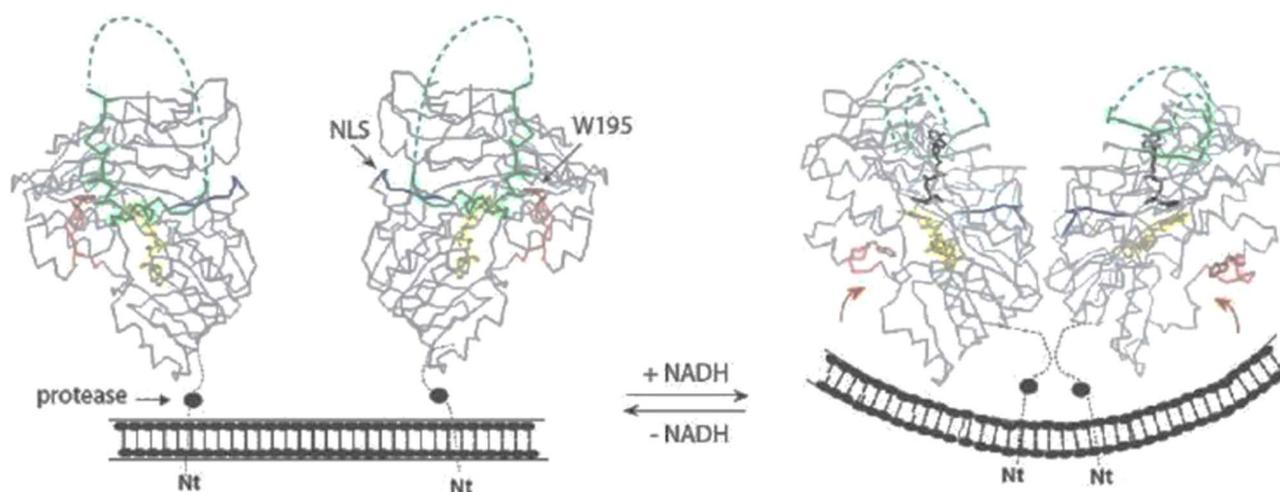


Рисунок 4. Образование устойчивого комплекса CTC при взаимодействии с NADH влияет на способность AIF индуцировать апоптоз. Мономер-димерный переход регулирует доступность NLS (синий цвет) и N-концевого сайта протеолиза (черные круги). Реорганизация последовательности 509-559 (зеленый) влияет на взаимодействие AIF с ДНК и ядерными белками [28].

Такие противоречивые результаты объясняются существованием двух пулов AIF внутри клетки. Часть AIF (около 70%) закреплена на внутренней мембране митохондрий с помощью трансмембранного сегмента AIF. Для диссоциации этих молекул необходимо нарушение целостности митохондриальной мембраны, активация протеаз и расщепление AIF по протеолитическому сайту между 96 и 120 а.к., приводящее к образованию растворимых $\Delta 1-102$ (57кДа) или $\Delta 1-118$ фрагментов AIF (55кДа) [21]. С другой стороны, около 30% AIF располагается на цитоплазматической поверхности наружной мембраны митохондрий (НММ). Эти молекулы связаны с мембраной намного слабее и для их диссоциации достаточно изменения

конформации AIF, вызванного взаимодействием этого белка с поли-АДФ-рибозой (PAR; **Рис. 5**), синтезируемой белком PARP1 в ответ на повреждение ДНК [18].

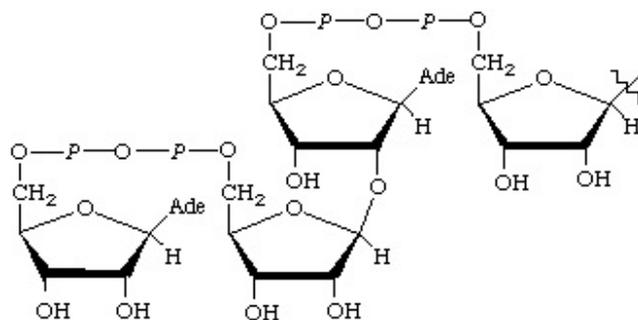


Рисунок 5. Химическая формула поли(АДФ-рибозы).

Взаимодействуя с AIF на внешней митохондриальной мембране, PAR вызывает его диссоциацию в цитоплазму (**Рис. 6**). PAR в данном случае выполняет роль сигнальной молекулы клеточной гибели, однако, как именно она способствует откреплению AIF от внешней митохондриальной мембраны, до сих пор точно неизвестно [21]. Было показано, что AIF имеет PAR-связывающий домен, и PAR, взаимодействуя с AIF, изменяет его конформацию [18].

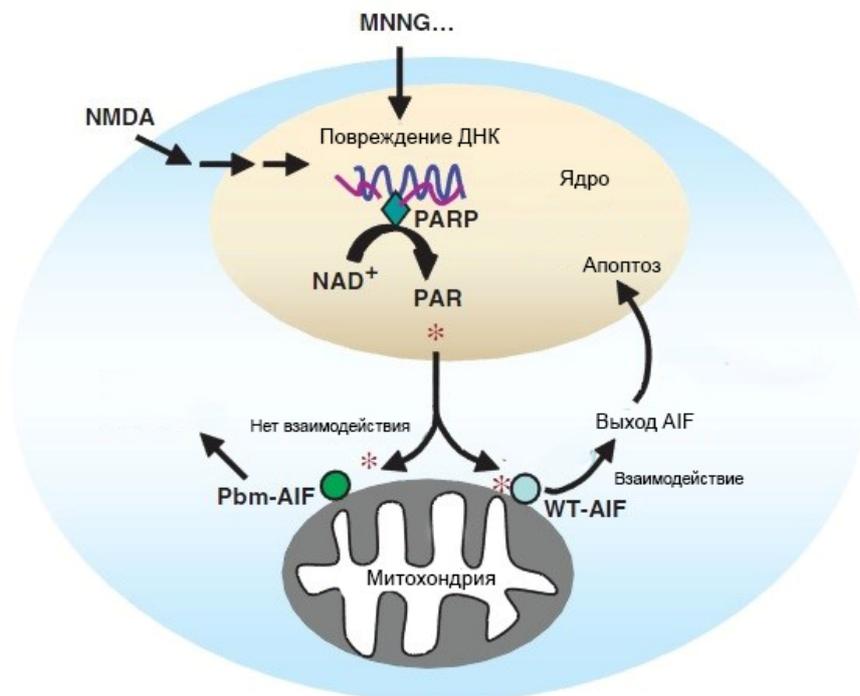


Рисунок 6. Схема PAR-зависимой транслокации AIF. При повреждении ДНК активируется фермент PARP1, катализирующий образования PAR. PAR транспортируется из ядра в цитозоль к митохондрии, где связывается с AIF на внешней митохондриальной мембране и вызывает его диссоциацию, что в итоге приводит к гибели клетки. В случае если PAR не взаимодействует с AIF, то апоптоза не происходит, и клетка выживает [18].

Детали молекулярного механизма связывания и диссоциации AIF от внешней мембраны митохондрии пока не известны. Однако существуют данные о том, что увеличение концентрации NaCl вызывает диссоциацию AIF от митохондрии, что маловероятно в случае, если бы AIF был прочно закорен на мембране своим трансмембранным доменом [18]. Более того, было показано, что при диссоциации AIF от внешней митохондриальной мембраны не происходит отщепления трансмембранного сегмента [21]. На основании этих данных можно с уверенностью предположить, что связывание AIF с внешней и внутренней мембранами митохондрии происходит по принципиально различным механизмам. Если в случае внутренней митохондриальной мембраны AIF непосредственно закорен в липидном бислое, то взаимодействие с внешней митохондриальной мембраной, скорее всего, происходит с участием белка-посредника.

После диссоциации AIF от митохондриальной мембраны происходит его транслокация в ядро. Полноразмерный AIF имеет две последовательности ядерного импорта: NLS1 (277-301 а.к.) и NLS2 (445-451 а.к.) (**Рис. 3**). Было показано, что перемещение AIF в ядро клетки происходит благодаря С-концевой последовательности NLS2, что подтверждается отсутствием у сплайс-форм AIF (AIFsh1 и AIFsh2) способности транспортироваться из цитоплазмы в ядро [29]. Важно отметить, что NLS2 взаимодействует с транспортными рецепторами ядра, только если AIF находится в форме мономера с окисленным FAD.

Попадая в ядро, AIF взаимодействует с гистоном H2AX и белком СурА. Образовавшийся тройной комплекс (**Рис. 7**) вызывает конденсацию хроматина и фрагментацию ДНК на участки размером около 50 к.б. Однако механизм данного процесса пока неизвестен. Интересно, что AIF может взаимодействовать с H2AX в отсутствие СурА, тогда как связь AIF*СурА без наличия H2AX не образуется [30, 31]. Это говорит в пользу последовательного связывания AIF*H2AX и затем AIF*H2AX*СурА. Также была показана возможность образования комплекса AIF с Эндонуклеазой G (EndoG), но на сегодняшний день нет прямых доказательств участия такого двойного комплекса конденсации хроматина. Судьба AIF после транслокации в ядро и деградации ДНК мало изучена. Существуют предположения, что на поздних стадиях апоптоза взаимодействие между хроматином и AIF снижается, и AIF перемещается обратно в цитоплазму [32].

Главными известными ингибиторами каспазезависимого пути апоптоза являются белки теплового шока. Так, белок Hsp70 специфически взаимодействует с AIF *in vitro* и *in vivo*, и блокирует его транслокацию в ядро [30]. Было показано, что за это взаимодействие отвечает участок AIF 150-228 а.к. (в особенности аргинин 192 и лизин 194), и удаление этой последовательности у AIF полностью блокирует антиапоптотное действие белка Hsp70 [23].

Этот результат подтверждается еще и тем фактом, что Hsp70 не может ингибировать апоптоз, вызванный AIFsh. Важно отметить, что для опухолевых клеток характерно многократное повышение экспрессии белков семейства Hsp70.

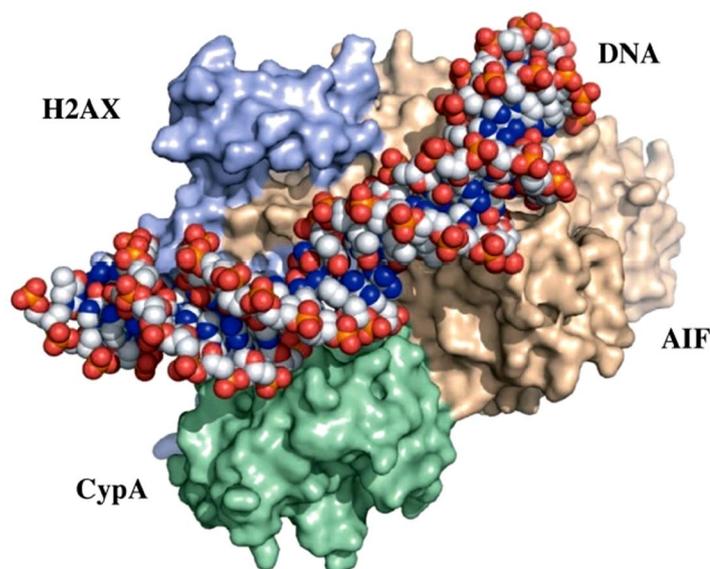


Рисунок 7. Структура комплекса AIF (коричневый цвет), СурА (зеленый цвет) и H2AX (синий цвет), индуцирующего деградацию ДНК [33].

В дополнение к ключевой роли в каспазезависимом апоптозе AIF также выполняет жизненно важные функции в энергетическом метаболизме митохондрии. Все попытки изучить роль AIF с помощью «нокаута» окончились неудачно, так как удаление этого белка приводит к смерти уже на самых ранних стадиях развития млекопитающих [34]. Нарушения в метаболизме, связанные с недостатком AIF, *in vivo* впервые были показаны на Hq (Harlequin) мышях – штамме грызунов с пониженной на 80% экспрессией AIF вследствие ретровирусной вставки в первом интроне гена *AIFM1* [35]. Для взрослых животных этой линии характерно отсутствие шерсти и прогрессирующее развитие нейродегенерации, атаксии и слепоты. Такие симптомы связаны с нарушениями в работе комплекса I электрон-транспортной цепи митохондрий [36]. Было показано, что AIF критически необходим для правильного функционирования данного комплекса, но его непосредственная роль доподлинно не известна. Вероятно, AIF необходим для правильной сборки комплекса I и участия в транспорте компонентов этого комплекса из ядра в митохондрию. Альтернативная модель, заключается в том, что AIF может поддерживать функциональность комплекса I, снижая уровень окисления входящих в него белков. Исследование клеток с пониженной экспрессией AIF показало повышенный уровень активных форм кислорода (ROS), однако дальнейшие опыты *in vitro* не подтвердили способности AIF

препятствовать образованию свободных радикалов [37]. По этой причине не исключено, что эффект AIF может являться результатом непрямого влияния на функционирование комплекса I электрон-транспортной цепи.

Таким образом, поскольку AIF помимо участия в процессе апоптоза играет важную роль в работе митохондрий, то его функциональная форма гарантированно будет присутствовать во всех типах клеток. Следовательно, запрограммированная клеточная гибель по AIF-индуцированному механизму теоретически может быть вызвана во всех типах опухолей. Однако, несмотря на большое количество работ, опубликованных в последние годы по изучению каспазезависимого пути апоптоза, первая и наиболее важная стадия этого процесса, а именно диссоциация AIF от наружной митохондриальной мембраны, до сих пор остаётся загадкой. Поэтому новые результаты, полученные при изучении этого вопроса, могут представлять высокую фундаментально-научную и прикладную ценность.

2.1.2. Каспаззависимый путь апоптоза.

Главными эффекторными белками каспаззависимого апоптоза являются каспазы - цистеиновые протеазы, расщепляющие полипептиды после остатка аспарагиновой кислоты. Активные каспазы образуются за счёт протеолитического процессинга прокаспаз. У млекопитающих идентифицировано 13 каспаз, часть из которых, однако, не участвует в гибели клетки (неапоптотические каспазы: 1, -4, -5, -11, -13). Апоптотические каспазы разделяют на инициаторные (каспазы: 2, -8, -9, -10, -12) и эффекторные (каспазы: 3, -6, -7). Инициаторные каспазы активируют эффекторные каспазы, которые в свою очередь расщепляют белки и вызывают гибель клетки.

Известно много механизмов активации внутреннего каспаззависимого пути апоптоза, однако в конечном итоге все они приводят к изменению конформации белков Вах или Вак [38]. После перехода Вах в апоптотическую конформацию он транспортируется из цитозоля во внешнюю митохондриальную мембрану, где он взаимодействует с другими белками и образует пору, проницаемую для высокомолекулярных соединений [39]. Через эту пору в цитоплазму транспортируются разнообразные белки индукторы апоптоза: цитохром-с, Smac/DIABLO, AIF и эндонуклеаза-G [20, 40]. Цитохром-с, попадая в цитоплазму, взаимодействует с dATP и белком Араф-1, после чего образовавшийся комплекс активирует прокаспазу-9 [41]. Каспаза-9 в свою очередь активирует эффекторные каспазы-3 и -7, расщепляющие белки цитоскелета и ядра. Всё это приводит к сжатию клетки, её откреплению от внеклеточного матрикса и фрагментации ДНК.

Основными ингибиторами каспазависимой клеточной гибели являются IAP белки (Inhibitor of Apoptosis Protein). Представители этого семейства были первоначально открыты у бакуловирусов, но позже были обнаружены IAP и не вирусной природы [41]. Эти белки характеризуются наличием одного или нескольких последовательностей, называемых Vaculoviral Iap Repeat (BIR). BIR домен считается главным медиатором антиапоптозных функций IAP [42]. Н сегодняшний день в клетках млекопитающих обнаружено 8 IAP белков: NIAP (BIRC1), c-IAP1 (BIRC2), c-IAP2 (BIRC3), XIAP (BIRC4), Survivin (BIRC5), BRUCE (BIRC6), ML-IAP (BIRC7) и ILP (BIRC8) (Рис. 8) [43] и для каждого из них характерен свой уникальный механизм защиты клетки от запрограммированной гибели.

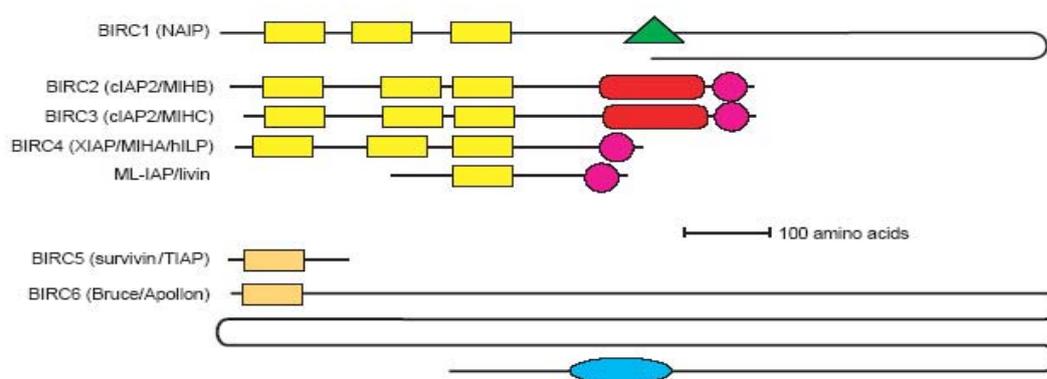


Рисунок 8. Схематическое изображение IAP человека. BIR домен обозначен прямоугольником жёлтого цвета (BIR домены белков Survivin и Bruce обозначены тёмно-жёлтым цветом, так как они имеют существенные отличия от BIR доменов других IAP). RING мотив обозначен розовым цветом, CARD домен – красным цветом. Зелёным цветом обозначен нуклеотидсвязывающий домен NIAP. Голубым цветом обозначен убиквитин-конъюгирующий домен Bruce [41].

Из всех IAP только XIAP способен напрямую ингибировать уже активированные каспазы, все остальные представители этого белкового семейства блокируют апоптоз, действуя через разнообразные белки посредники [43].

Активность IAP в клетке контролируется по нескольким механизмам. Во-первых, количество этих белков регулируется с помощью изменения уровня экспрессии соответствующих генов [44], а также благодаря деградации IAP в протеасоме [45]. Другой уровень контроля над IAP осуществляется белками, имеющими N-концевой тетрапептид (Ala-Val-Pro-Ile), называемый IBM мотивом (Iap Binding Motif). IBM белки могут ингибировать активность IAP, взаимодействуя с их BIR доменом. Smac/DIABLO - это первый открытый IBM

белок человека. После трансляции полноразмерный Smac/DIABLO перемещается в межмембранное пространство митохондрий, где от него отщепляются первые 55 аминокислот, которые представляют собой последовательность митохондриальной локализации. Отщепление этого пептида приводит к тому, что на N-конце Smac/DIABLO открывается IBM. В ответ на различные апоптозные стимулы зрелый Smac/DIABLO может транспортироваться из межмембранного пространства митохондрии в цитоплазму и ингибировать IAP, индуцируя активацию каспаз. Активированные же каспазы могут в свою очередь расщеплять некоторые белки, в которых после протеолиза также будет открываться IBM. Это приведёт к ещё более сильному ингибированию IAP, и, в результате, вызовет ещё большую активацию каспаз в клетке [45]. Подробная схема описанного выше механизма приведена на **рисунке 9**.

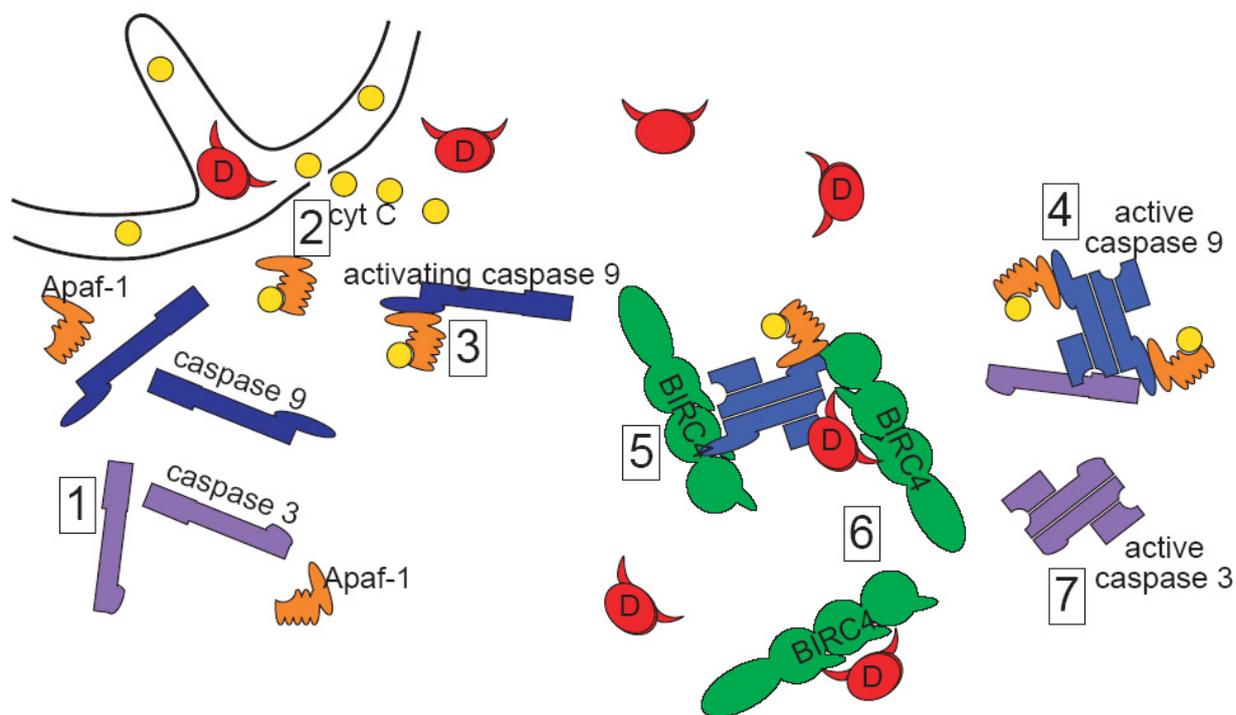


Рисунок 9. *Схема митохондриального пути клеточной гибели. Жёлтым цветом обозначен цитохром-с. Красным цветом - белок Smac/DIABLO; оранжевым - белок Apaf-1; синим - каспаза-9; зелёным - белок XIAP; фиолетовым цветом обозначена каспаза-3. В нормальных клетках каспазы присутствуют только в неактивной зимогенной форме (1). Цитохром-с, вышедший из межмембранного пространства митохондрий после индукции апоптоза, вместе с dATP связывается с Apaf-1 (2), образовавшийся комплекс активирует прокаспазу-9 (3). Каспаза-9 в свою очередь расщепляет (4) и активирует прокаспазу-3 (7). Белок XIAP (BIRC4), постоянно находящийся в цитозоле, может связываться с активированной каспазой-9 и таким образом не давать ей активировать прокаспазу-3 (5). Однако если в цитозоль из межмембранного пространства митохондрий перемещается достаточно большое количество белка Smac/DIABLO (D) (2), то Smac/DIABLO будет взаимодействовать с XIAP (6), что в итоге приведёт к высвобождению активной каспазы-9 и последующей активации каспазы-3 (7) [41].*

Биологический смысл существования столь большого разнообразия ингибирующих друг друга белков заключается в создании механизма очень тонкой регуляции порога чувствительности клеток к факторам, вызывающим апоптоз. Изменяя количество того или иного белка регулятора апоптоза, клетка может устанавливать для себя ту интенсивность внешнего или внутреннего воздействия, которой окажется достаточно для запуска необратимых каскадов запрограммированной гибели.

2.1.2.1. Характеристика белка *Survivin*.

Survivin является наиболее маленьким IAP человека, он имеет молекулярную массу 16,5 кДа [46] и в растворе существует в виде гомодимера [47]. Ранее предполагалось, что мономер белка *Survivin* не имеет биологических функций [48, 49], однако в последние годы накапливаются данные о том, что во многих процессах участвует именно мономерная форма этого белка [50, 51]. Повышенная экспрессия белка *Survivin* придаёт опухолевым клеткам устойчивость к действию разнообразных методов терапии, а ингибирование активности белка *Survivin*, напротив, приводит к гибели раковых клеток, не влияя на здоровые ткани организма [40, 52]. Однако, несмотря на значительное количество данных, посвящённых исследованию функций этого белка, механизм, по которому он предотвращает апоптоз, до сих пор не до конца ясен.

Наиболее характерная изоформа белка *Survivin* состоит из 142х аминокислот и имеет единую третичную структуру без отделённых друг от друга доменов [51]. В молекуле белка *Survivin* присутствует единственный BIR домен (15-87 а.к.), связывающий катион Zn^{2+} . В состав BIR домена входят 3 антипараллельные цепочки, формирующие β -складки, и окруженные четырьмя короткими α -спиралями (Рис. 10А). Цинк хелатируется высоко консервативными цистеинами 57, 60, и 84 и гистидином 77. На С-конце *Survivin* имеет длинную α -спираль (99-142 а.к.), обладающую амфифильными и гидрофильными свойствами [48] (Рис. 10Б).

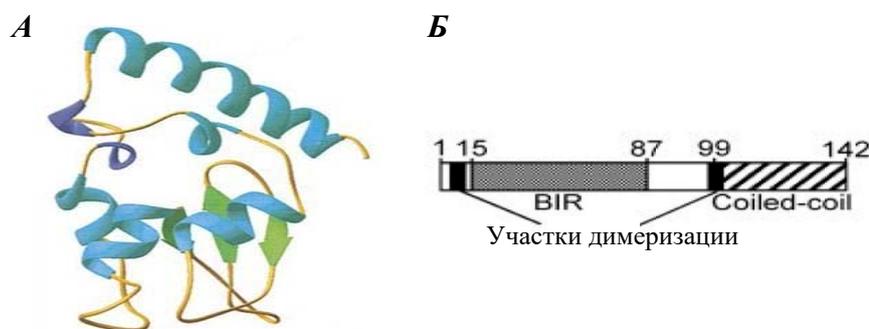


Рисунок 10. Структура мономера белка *Survivin*. А - Структура, изображённая с помощью ленты. Зелёным изображены β -складки; синим - α -спирали; фиолетовым - области, принимающие участие в димеризации. Б - Схематическая диаграмма строения белка *Survivin*. Обозначены участки димеризации, BIR домен и С-концевая α -спираль [48, 53].

Методами ЯМР и рентгенокристаллографии было показано, что димер белка Survivin имеет форму «галстука-бабочки» (**Рис. 11**) [47]. Димеризация осуществляется благодаря двум гидрофобным областям: одна из которых располагается на N-конце (6-10 а.к.), а вторая на участке между V1R доменом и С-терминальной α -спиралью (89-102 а.к.) [50]. При формировании димера лейцин 98 одной молекулы заходит в гидрофобный карман, образованный второй молекулой (лейцин 6, триптофан 10, фенилаланин 93 и 101 и лейцин 102) [51].

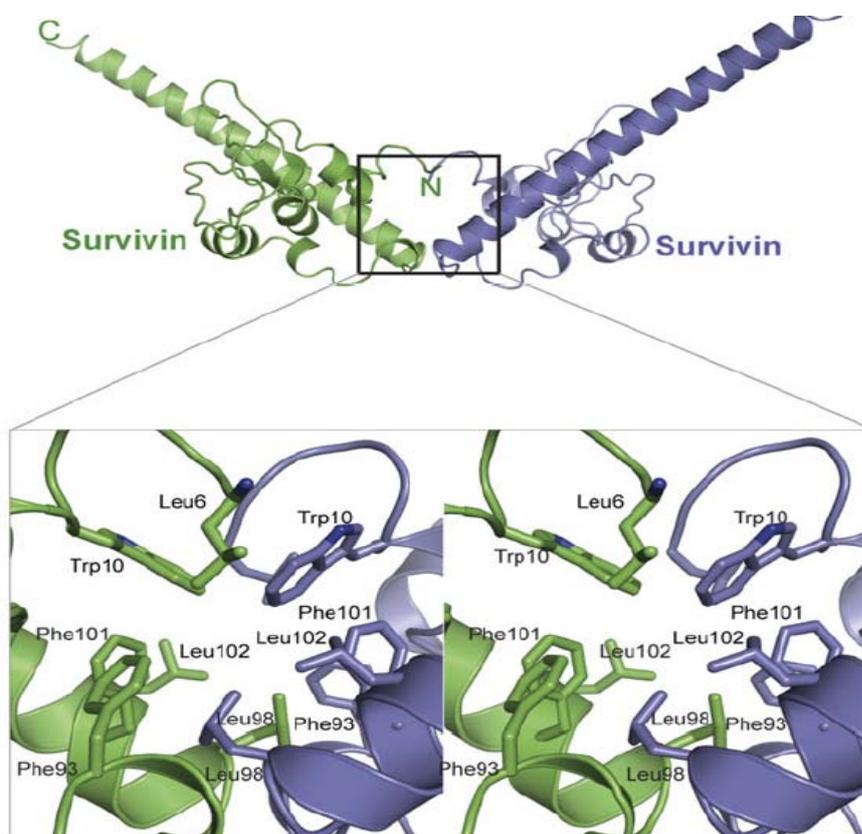


Рисунок 11. Димер белка Survivin. Структура димера, показанная с помощью ленты. Ниже показаны аминокислотные остатки, необходимые для взаимодействия двух мономеров в составе димера [51].

Важно подчеркнуть, что недавно опубликованные данные Ванга и коллег убедительно продемонстрировали, что в клетке существует специальный механизм регуляции равновесия между димерной и мономерной формами существования белка Survivin. Он осуществляется посредством ацетилирования белка по различным остаткам лизина ферментом СВР - ацетилтрансферазой гистонов. По-видимому, наибольшую роль в регуляции равновесия играет присоединение ацильной группы к 129ому остатку лизину белка Survivin, что значительно смещает реакцию в сторону образования димеров [54].

В здоровых, не раковых, клетках количество белка Survivin строго контролируется прогрессией клеточного цикла. В интерфазе Survivin почти полностью отсутствует, однако при начале деления, в G₂/M стадии клеточного цикла, наблюдается резкое увеличение экспрессии гена *BIRC5* (он кодирует Survivin) и соответствующее увеличение продукции этого белка. В течение всего митоза Survivin присутствует в клетке на достаточно высоком уровне (в сравнении с интерфазой, однако всё равно существенно ниже, чем в раковых клетках). При завершении процесса митоза, в начале G₁ фазы клеточного цикла, количество белка Survivin резко снижается благодаря его быстрой деградации в протеасоме [55]. В отличие от здоровых клеток, в раковых клетках Survivin обнаруживается на высоком уровне на протяжении всех стадий клеточного цикла. Причины этого кроются как в дисрегуляции экспрессии гена *BIRC5*, так и в нарушении процессов деградации данного белка [56].

В интерфазе Survivin локализуется в основном в цитоплазме в соотношении цитоплазма/ядро 6 к 1 [57]. Большинство учёных выделяют три пула белка Survivin: ядерный – регулирующий экспрессию генов и митоз, цитозольный - участвующий в формировании сети микротрубочек и митохондриальный – защищающий клетки от апоптоза [58]. Функциональные отличия этих пулов объясняются тем, что в различных компартментах клетки Survivin имеет разные посттрансляционные модификации [59, 60].

Survivin способен активно перемещаться из цитоплазмы в ядро и обратно. Выход этого белка из ядра осуществляется по CRM1 зависимому механизму. CRM1 - экспортный рецептор, связывающий последовательность ядерного экспорта (NES) и транспортирующий белки из ядра в цитоплазму. Survivin имеет как минимум две NES. Они находятся на участках 84-109 а.к. и 119-142 а.к., и каждой из них достаточно для экспорта белка Survivin в цитоплазму. Из структуры димера белка Survivin (**Рис. 11**) видно, что одна из NES (84-109 а.к.) перекрывается с участком димеризации (89-102 а.к.), и, следовательно, при формировании димера она оказывается закрытой для связывания с рецептором CRM1. По этой причине димер белка Survivin имеет гораздо более низкую аффинность к CRM1 и существенно хуже, чем мономер экспортируется из ядра. Из-за этого Survivin, ацетилированный по 129ому лизину, который, как упоминалось ранее, значительно более подвержен димеризации, преимущественно располагается в ядре, в то время как неацетилированный Survivin, наоборот, находится в цитоплазме [54]. На сегодняшний день считается маловероятным, что Survivin может подвергаться активному импорту в ядро. Эксперименты показали, что этот белок не несёт последовательности ядерной локализации (NLS). Однако низкая молекулярная масса белка Survivin позволяет ему свободно проникать в ядро путём пассивной диффузии.

Во время митоза Survivin имеет локализацию, характерную для белков комплекса пассажиров хромосом (CPC) (**Рис. 12**). После исчезновения ядерной оболочки в начале митоза белки CPC перемещаются во внутреннее пространство центромер конденсированных хромосом. В анафазе при миграции хромосом к полюсам клетки белки CPC диссоциируют от центромер и остаются на микротрубочках центральной части веретена деления. Наконец, во время цитокинеза белки CPC располагаются в остаточном тельце между двумя дочерними клетками [51].

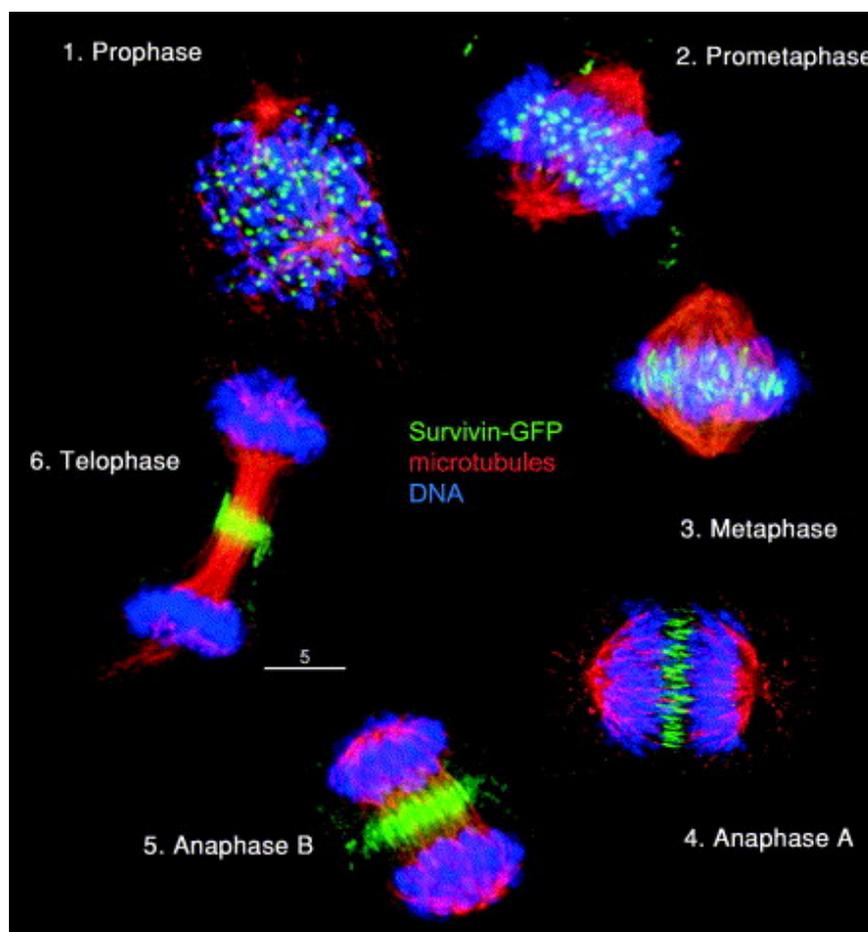


Рисунок 12. Локализация белков CPC во время митоза. Фотографии клеток *HeLa*, экспрессирующих *Survivin-GFP* (зелёный цвет) на различных стадиях митоза: 1-профаза, 2-прометафаза, 3-метафаза, 4-анофаза А, 5-анофаза В, 6-телофаза. Клетки были окрашены антителами к β -тубулину (красный цвет), и *DAPI* для визуализации ДНК (синий цвет) [61].

Недавние работы продемонстрировали, что компоненты, регулирующие ядерный экспорт белка Survivin в интерфазе, критически необходимы и для прогрессии митоза. Предполагается, что в начале профазы митоза CRM1 транспортирует Survivin в составе CPC к центромере [58, 62]. В конце деления после формирования ядерной оболочки, CRM1 удаляет выполнивший свою функцию Survivin из ядра, после чего Survivin деградирует в протеасоме [63].

2.1.2.2. Механизм антиапоптозного действия белка Survivin.

Survivin способен ингибировать каспазозависимый и каспазезависимый пути апоптоза на различных стадиях по нескольким принципиально разным механизмам. Однако, то какой из этих механизмов играет основную роль, а какие лишь вспомогательную до сих пор непонятно.

Самая ранняя стадия, на которой Survivin может ингибировать каспазозависимый путь апоптоза - это предотвращение активации прокаспазы-9. Было показано, что Survivin, в отличие от XIAP не может связываться с каспазой-9 напрямую, однако с помощью BIR домена Survivin способен взаимодействовать с белком HBXIP (Hepatitis B X-Interacting Protein), причём это взаимодействие многократно усиливается фосфорилированием белка Survivin по треонину 34. Комплекс Survivin и HBXIP связывается с прокаспазой-9, не позволяя ей взаимодействовать с Araf-1. Таким образом, прокаспазы-9 не может перейти в активированную форму. Важно отметить, что комплекс Survivin*HBXIP способен лишь предотвращать активацию прокаспазы-9, но не ингибировать расщеплённую каспазу-9 [64].

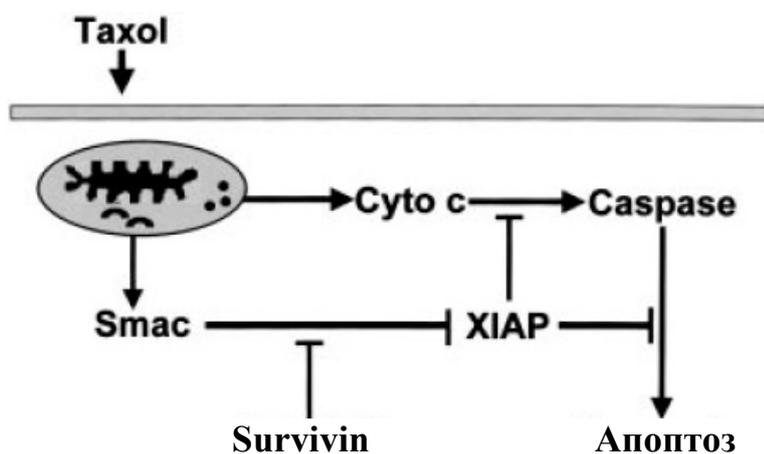


Рисунок 13. Модель антиапоптозной активности белка Survivin через ингибирование Smac/DIABLO. Smac/DIABLO выходит в цитоплазму из межмембранного пространства митохондрий под действием различных индукторов апоптоза. Далее Smac/DIABLO взаимодействует с белком Survivin, экспрессия которого увеличена в опухолевых клетках. Survivin понижает нейтрализующий эффект Smac/DIABLO на белок XIAP. XIAP, в свою очередь, сохраняет способность ингибировать каспазы и предотвращать апоптоз [65].

Более поздняя стадия, на которой Survivin может предотвращать запрограммированную гибель клетки - это ингибирование проапоптозного белка Smac/DIABLO. Как упоминалось выше, после действия разнообразных индукторов апоптоза зрелый Smac/DIABLO выходит из межмембранного пространства митохондрий, и связывается с белком XIAP, нейтрализуя его антиапоптозную активность. Было показано, что Survivin может конкурировать с XIAP за

взаимодействие с белком Smac/DIABLO, и таким образом защищать XIAP от нейтрализации. По этой причине из-за повышения экспрессии белка Survivin в опухолевых клетках большая часть Smac/DIABLO, вышедшего из межмембранного пространства митохондрий, оказывается связанной с белком Survivin, а не с другими IAP, благодаря чему в цитоплазме остаётся больше свободного белка XIAP, способного ингибировать каспазы [45]. Это в итоге ведёт к повышению устойчивости опухолевых клеток к апоптозу и к химиотерапии в целом (**Рис. 13**) [65].

При формировании комплекса Survivin-Smac/DIABLO первые четыре аминокислотных остатка зрелого Smac/DIABLO взаимодействуют с гидрофобным карманом на BIR домене белка Survivin (**Рис. 14**). В дополнение к этому положительно заряженная N-концевая аминогруппа Smac/DIABLO образует солевые мостики с отрицательно заряженными остатками аспарагиновой (71) и глутаминовой (76) кислот белка Survivin. Интересно, что эти взаимодействия значительно сильнее в комплексе Survivin-Smac/DIABLO, чем аналогичные связи в комплексе XIAP-Smac/DIABLO, так как BIR домен белка Survivin имеет большее сродство к AVPI пептиду, чем BIR домен XIAP.

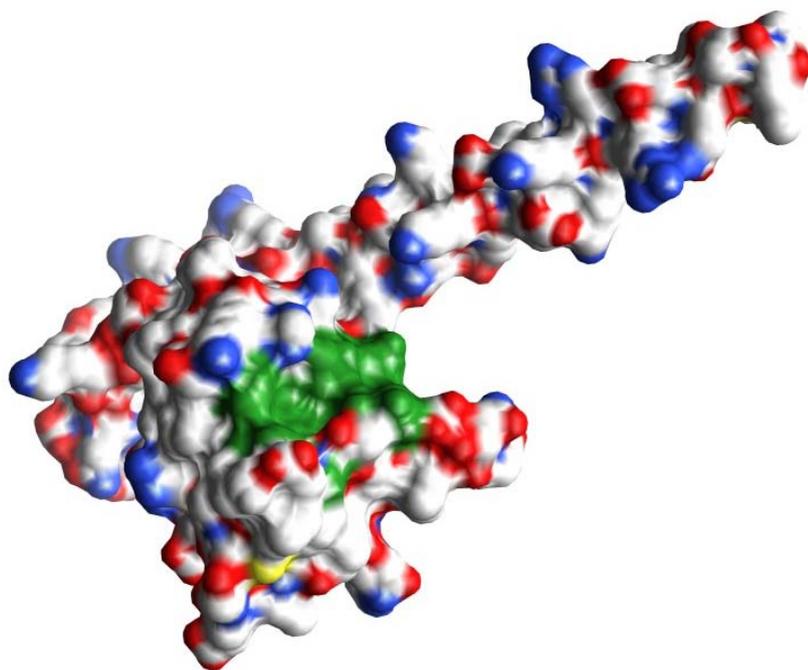


Рисунок 14. Структура поверхности белка Survivin. Зелёным цветом обозначена поверхность взаимодействия данного белка с белком Smac/DIABLO.

Существует гипотеза о том, что Smac/DIABLO связывается только с димерами белка Survivin. Эта теория позволяет объяснить существование большого количества разнообразных доминантно-негативных мутантов белка Survivin, которые не только не могут защищать клетку от гибели, но и, наоборот, обладают значительным проапоптозным эффектом. Было доказано,

что эти мутанты не взаимодействуют с белком Smac/DIABLO, и поэтому они неспособны защищать клетку от запрограммированной гибели. Проапоптотная активность мутантов белка Survivin была объяснена с помощью предположения о том, что Survivin ингибирует Smac/DIABLO, находясь только в виде димера, а присутствие мутантных форм этого белка приводит к формированию нефункциональных гетеродимеров состава Survivin^{WT}-Survivin^{mut}. Это уменьшает количество нормальных гомодимеров белка Survivin и, как следствие, снижает защиту клетки от апоптоза. [49].

Кроме ингибирования белка Smac/DIABLO Survivin способен защищать клетки от гибели, увеличивая стабильность белка XIAP. Было показано, что Survivin может напрямую взаимодействовать с XIAP, что предотвращает разрушение последнего в протеасоме. Таким образом, Survivin повышает количество XIAP в клетке, что в свою очередь усиливает ингибирование каспаз и общую защиту от апоптоза [66].

Другой механизм антиапоптотного действия белка Survivin - это защита клеток от каспазезависимого апоптоза. Было показано, что Survivin может препятствовать выходу AIF из межмембранного пространства митохондрий, однако механизм этого процесса до сих пор неясен. Интересно, что при ингибировании белка Survivin в клетке прежде всего начинается апоптоз по каспазезависимому пути, и лишь потом запускается активация каспаз [40].

2.1.2.3. Влияние белка Survivin на микротрубочки.

Другая функция белка Survivin, на первый взгляд не связанная с его ролью в ингибировании апоптоза, это регуляция стабильности микротрубочек. Наиболее хорошо изучено влияние этого белка на веретено деления.

При митозе происходят многочисленные перегруппировки хромосом и цитоскелета, необходимые для обеспечения правильного распределения наследственного материала между дочерними клетками. В регуляции этих процессов важнейшую функцию выполняет комплекс белков-пассажиров хромосом (CPC). Он вовлечён в конденсацию хромосом, формирование веретена деления, обеспечение правильного связывания микротрубочек с кинетохорами и в завершение цитокинеза. CPC состоит из одного фермента - киназы Аврора Б и из трёх регуляторных белков - INCENP, Survivin и Borealin (**Рис. 15**). Функции белков Survivin, INCENP и Borealin заключаются в обеспечении взаимодействия Авроры Б с правильными субстратами в нужном месте и в определённое время. Важно отметить, что в состав CPC Survivin входит в виде мономера. Связываясь в комплекс, эти белки образуют узел из трёх α -спиралей, в котором α -спираль белка Survivin расположена параллельно α -спирали INCENP и антипараллельно α -спирале белка Borealin. Центральная часть этого узла сформирована благодаря взаимодействию

остатков гидрофобных аминокислот. В дополнение к этому прочность связывания увеличивают электростатические взаимодействия. Формирование CPC вызывает вынужденное изменение конформации белка Survivin. Интересно, что третичные структуры этого белка в составе димера и в составе CPC существенно отличаются друг от друга. При образовании димера лейцин 98 одной молекулы заходит в гидрофобный карман, формируемый другой молекулой. В CPC этот гидрофобный карман белка Survivin занят остатками аминокислот белка Borealin и прикрыт снизу гидрофобными радикалами аминокислот INCENP (Рис. 15). Образование комплекса Survivin-Borealin выглядит как молекулярная мимикрия взаимодействий Survivin-Survivin. Важно отметить, что при формировании CPC происходит маскирование многих консервативных остатков аминокислот, однако BIR домен белка Survivin остаётся открытым и таким образом теоретически может участвовать в других белок-белковых взаимодействиях [51].

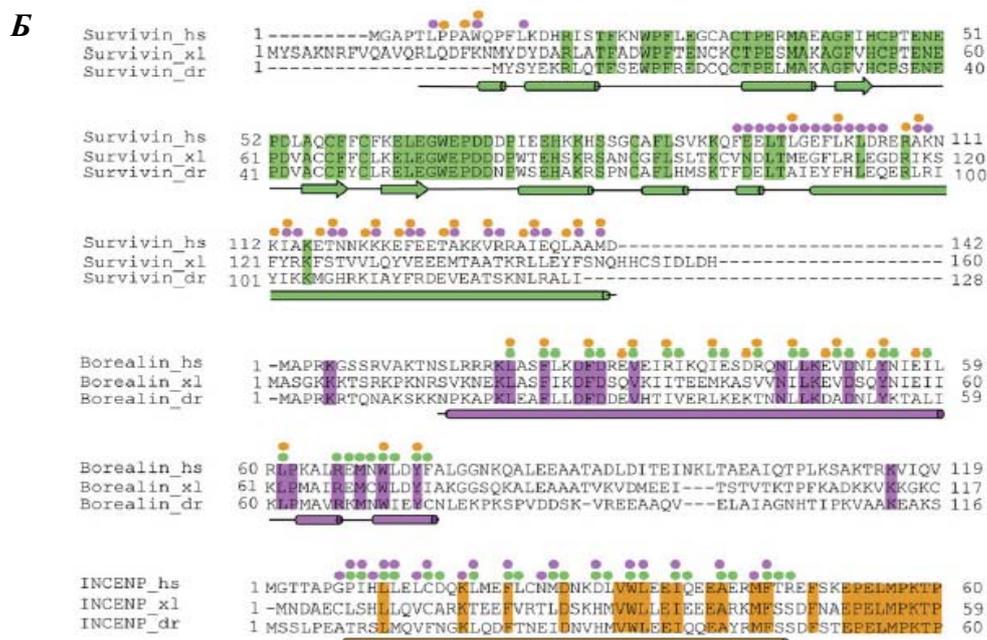
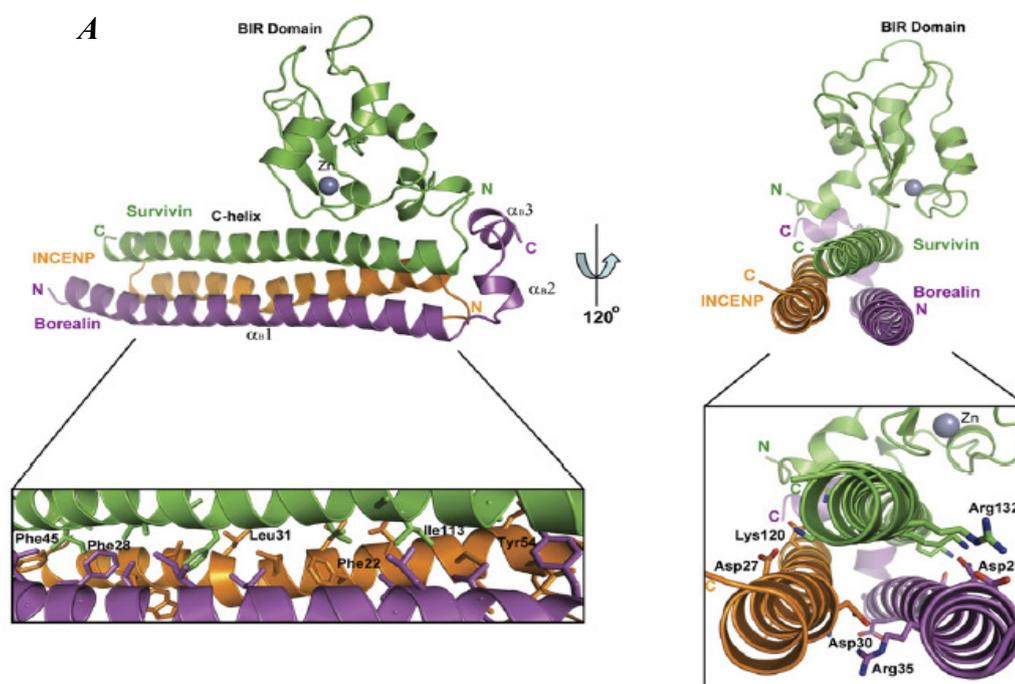


Рисунок 15. Структура СРС. А - Полная структура СРС. Комплексы показаны с двух сторон. Обозначены С- и N- концевые последовательности белков. Borealin (фиолетовый цвет) и INCENP (оранжевый цвет) взаимодействуют с α -спиралью белка Survivin (зелёный цвет), образуя узел из трёх α -спиралей. На увеличенном участке слева показаны аминокислотные остатки, формирующие гидрофобные взаимодействия внутри узла из α -спиралей. На увеличенном участке справа показаны аминокислотные остатки, формирующие межмолекулярные солевые мостики, расположенные на наружной поверхности α -спиралей в узле. Б - Консервативные аминокислоты, участвующие во взаимодействия белков СРС. Элементы вторичной структуры белков СРС показаны под соответствующей аминокислотной последовательностью. Изображены аминокислотные последовательности белков Survivin, Borealin и INCENP у человека (hs), лягушки (xl) и рыбы (dr), выделены консервативные аминокислотные остатки. Над аминокислотной последовательностью разными цветами обозначены остатки, взаимодействующие с белками Borealin, INCENP и Survivin (фиолетовые, оранжевые и зелёные круги соответственно) [51].

Одна из функций СРС заключается в регулировании системы чекпойнта веретена деления и предотвращении монополярного прикрепления микротрубочек к кинетохорам [67]. В ходе метафазы митоза Survivin, в отличие от остальных белков СРС, показывает высокую мобильность и способен легко диссоциировать и обратно ассоциировать с СРС. Для такой высокой подвижности белка Survivin необходима ферментативная активность Авроры Б, которая может фосфорилировать Survivin по треонину 117. Фосфорилированный Survivin связан с белками СРС слабо и легко диссоциирует, тогда как нефосфорилированный Survivin ассоциирован с СРС столь же прочно, как и другие белки пассажиры хромосом [68]. При монополярном присоединении микротрубочек сестринские кинетохоры оказываются сближенными друг с другом, а также с центральной частью центромера, в которой локализуется СРС (**Рис. 16**). Такое соседство даёт возможность белкам кинетохор влиять на белки СРС (возможно через посредников; природа данных взаимодействий пока не ясна) [67]. Эти взаимодействия вызывают фосфорилирование белка Survivin. Присоединение фосфатной группы приводит к диссоциации этого белка от СРС и исчезновению киназной активности у Авроры Б [69]. А это, как было продемонстрировано ранее, ведёт к деполимеризации микротрубочек, прикрепленных к кинетохорам. Вскоре после диссоциации, Survivin дефосфорилируется и обратно присоединяется к СРС, благодаря чему повторно активируется Аврора Б. Если в этот раз произошло правильное, биполярное, присоединение микротрубочек, то СРС остаётся активным, и деполимеризации микротрубочек не происходит. Таким образом, Survivin подвергается

циклическому фосфорилированию и дефосфорилированию по треонину 117 до тех пор, пока микротрубочки не будут биполярно присоединены к кинетохорам сестринских хроматид [68].

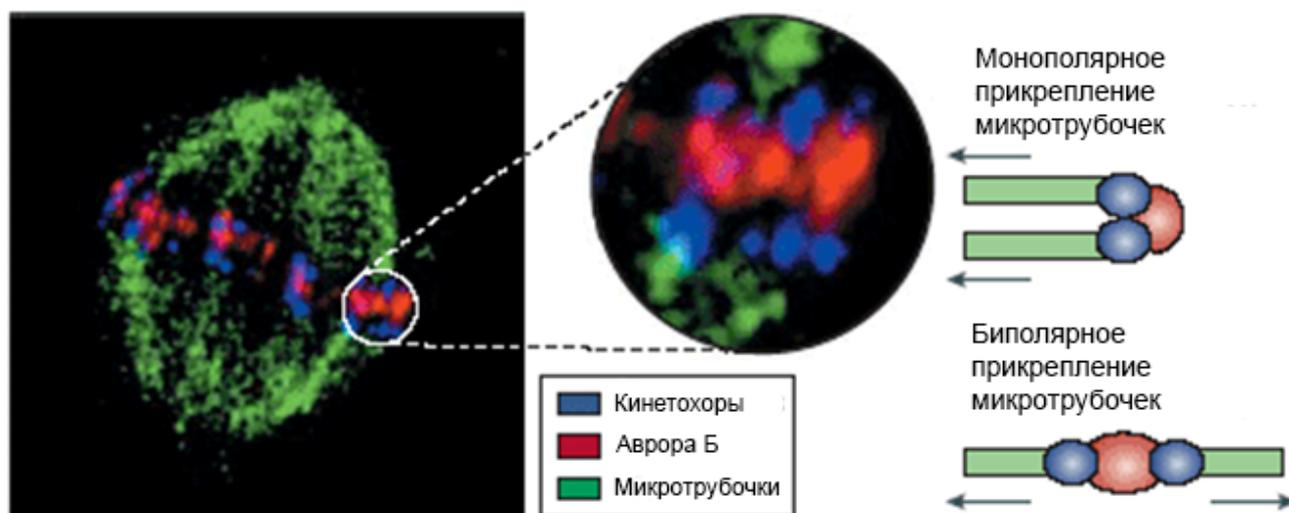


Рисунок 16. Схема регуляции прикрепления микротрубочек к кинетохорам. Фотография клетки в метафазе, окрашенной антителами к микротрубочкам (зелёный цвет), кинетохором (синий цвет) и Авроре Б (красный цвет). Аврора Б локализуется в центромере между двумя сестринскими кинетохорами. Справа показано, что биполярное прикрепление микротрубочек ведёт к растяжению центромер и увеличению дистанции между кинетохорами. При монополярном прикреплении микротрубочек расстояние между кинетохорами, напротив, уменьшается [70].

Несколькими независимыми авторами было продемонстрировано, что Survivin может повышать стабильность микротрубочек независимо от функционирования CPC. Причём не только во время митоза, но и в течение всего клеточного цикла [71]. Механизм, по которому Survivin стабилизирует микротрубочки без участия CPC, к настоящему моменту не известен, однако было показано, что Survivin способен напрямую взаимодействовать с микротрубочками *in vitro* [72]. Возможно, благодаря своей уникальной форме, димер белка Survivin играет роль адаптера между полимеризованным тубулином и белками, стабилизирующими микротрубочки. Таким образом, как и в случае защиты клетки от апоптоза, при формировании веретена деления существует два различных пула белка Survivin, один из которых регулирует динамику микротрубочек вблизи кинетохор через белки CPC, а второй влияет на стабильность периферических микротрубочек веретена деления по иному механизму, в котором, вероятно, также участвует и малая GTPаза Ran [56, 73].

2.1.3. Активные формы кислорода при апоптозе.

В предыдущих пунктах были описаны ранние этапы запрограммированной клеточной гибели, на которых происходит выход из митохондрий белков-индукторов апоптоза AIF, цитохром С, Smac/DIABLO и др. В клетках существуют механизмы блокирования их активности с помощью белков-ингибиторов апоптоза таких как Hsp70, Survivin, XIAP и др. Если количества антиапоптотных белков оказалось недостаточным, и программа клеточной гибели всё-таки была запущена, то на следующем её этапе происходит нарушение функционирования митохондрий (Рис. 17). В случае каспазезависимого пути апоптоза оно связано с диссоциацией белка AIF и последующей дисрегуляцией работы комплекса I электрон-транспортной цепи. В случае каспазезависимого апоптоза механизм нарушения функций митохондрий более сложен.

Как упоминалось выше, цитохром С выходит из межмембранного пространства митохондрий (МПМ) через поры, образованные белками Вах или Вак [38], и активирует прокаспазу-9 вблизи митохондриальной мембраны. Далее часть молекул каспазы-9 диффундирует в цитоплазму, где разрушает клеточные белки, а часть проходит внутрь МПМ через образовавшиеся ранее поры. Там каспаза-9 расщепляет некоторые белки I и II комплексов электрон-транспортной цепи митохондрий (Рис. 17) [74, 75]. Кроме того, существенный вклад в нарушение функции митохондрий вносит и понижение концентрации самого цитохрома С в МПМ, которое блокирует перенос электронов между III и IV комплексами электрон-транспортной цепи.

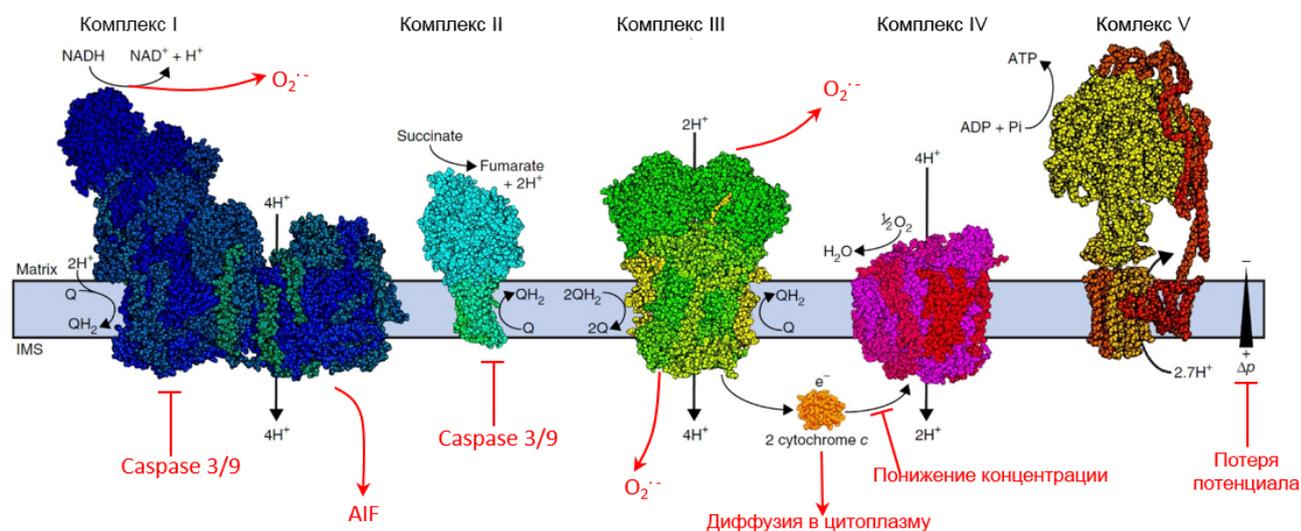


Рисунок 17. Нарушения работы электрон-транспортной цепи митохондрий при апоптозе. Красным цветом обозначено расщепление каспазами белков I и II комплексов, продукция активных форм кислорода, диссоциация AIF и цитохрома С, а также понижение мембранного потенциала митохондрий [76, 77].

Все эти события приводят к продукции митохондриями активных форм кислорода (ROS). Даже в нормальных условиях при работе электрон-транспортной цепи около 0.2-2% всего кислорода, поглощённого митохондриями, преобразуется в ROS, однако на промежуточных стадиях апоптоза эта цифра увеличивается более чем в 10 раз [75, 76]. Такое высокое содержание ROS способствует дальнейшему повреждению митохондрий, истощению восстановленного глутатиона и ещё более сильной активации каспаз и повреждению ДНК. Однако даже на этом этапе апоптоза, клетки (в особенности опухолевые клетки) всё ещё могут предотвратить свою смерть.

Существует большое количество белков, обладающих антиоксидантными свойствами. Эти белки могут как напрямую нейтрализовать ROS, так и восстанавливать биомолекулы, которые оказались повреждены в ходе взаимодействия с ROS. Одним из таких белков является Параоксоназа 2 (PON2).

Семейство параоксоназ включает в себя три фермента- PON1, PON2 и PON3. Филогенетический анализ этих белков показал, что PON2, по-видимому, является самым древним представителем этой группы, от которого позднее в ходе эволюции произошли PON1 и PON3 [78]. Все эти ферменты обладают выраженной лактоназной активностью, однако отличаются друг от друга по субстратной специфичности и профилю экспрессии. PON2 экспрессируется фактически во всех тканях человеческого организма и располагается преимущественно внутри клетки. Интересно отметить, что в некоторых типах клеток основная функция PON2 связана именно с антиоксидантной активностью этого фермента [79]. Так было показано, что PON2 значительно снижает продукцию супероксид-ионов, взаимодействуя с первым и третьим комплексом электрон-транспортной цепи на внутренней митохондриальной мембране, а также ингибирует перекисное окисление липидов плазматической мембраны [80]. Важно отметить, что антиоксидантная активность PON2 не зависит от лактоназной активности этого фермента [12].

Детальные исследования структуры PON2 показали, что этот белок имеет массу около 40 кДа, содержит два сайта гликозилирования, короткий внутриклеточный участок (1-5 а.к.), трансмембранный домен из одной альфа спирали (6-24 а.к.), а также гидрофобный участок (67-81 а.к.) и ферментативный домен (168-246 а.к.), расположенные с наружной стороны клеточной мембраны. Благодаря трансмембранному домену в процессе трансляции PON2 встраивается в липидный бислой и распределяется между эндоплазматическим ретикуломом, перенуклеарной областью, митохондриями и плазматической мембраной [15, 80-82].

В настоящее время интерес к параоксоназе 2 существенно возрос из-за выявленной связи этого белка с прогрессией злокачественных новообразований. За последний год многими

авторами была описана важная роль PON2 в опухолевых клетках. Так было показано, что PON2 способствует росту и метастазированию рака поджелудочной железы, стимулируя захват глюкозы [83], также PON2 ускоряет пролиферацию и устойчивость к окислительному стрессу рака мочевого пузыря [84], защищает от апоптоза клетки глиобластомы [85] и снижает чувствительность к радиотерапии клеток карциномы ротовой полости [86]. Однако точная роль PON2 в других видах рака пока не установлена.

2.1.4. Роль трансглутаминазы-2 при апоптозе.

Если ни один из механизмов, описанных выше, не помог клетке предотвратить начало и прогрессию апоптоза, то финалом этого процесса является активация эффекторных каспаз, в первую очередь каспазы-3, которая разрушает клеточные белки. Долгое время считалось, что активация каспазы-3 является точкой невозврата, после прохождения которой любая клетка обречена на смерть. Однако последние данные указывают на то, что даже на этом этапе апоптоза опухолевые клетки способны предотвращать свою гибель. Так в работе Ямагучи и Ванга был продемонстрирован интереснейший механизм, по которому раковые клетки способны эффективно ингибировать каспазу-3, благодаря активности кросс-сшивающего фермента - Трансглутаминазы 2 (TGM2) [87].

Трансглутаминазы (EC 2.3.2.13) - это семейство из восьми ферментов, которые образуют кросс-сшивки между белками посредством формирования ϵ -(γ -глутамил)лизин изопептидной связи. TGM2 - единственная трансглутаминаза, экспрессирующаяся во всех тканях человеческого организма, она присутствует как внутри клеток, так и во внеклеточном пространстве. Уникальной особенностью TGM2 является то, что кроме кросс-сшивания белков она обладает большим количеством других важных ферментативных активностей. Более того, TGM2 участвует во многих патологических процессах, таких как восстановление повреждённых тканей, аутоиммунные заболевания, дегенеративные заболевания (артрит и атеросклероз), некоторые нейродегенеративные заболевания (болезнь Паркинсона, Альцгеймера и Хантингтона), но наибольшее внимание к TGM2 привлекла её необычная роль в развитии злокачественных опухолей [88].

Ген TGM2 находящийся в локусе q11-12 20й хромосомы, состоит из 13 экзонов и кодирует мономерный белок из 687 аминокислот массой 78кДа. Структурно TGM2 состоит из четырёх различных доменов: N- концевой домен в виде β - сэндвича (1-139 а.к.), каталитический домен (140-454 а.к.) и два домена со структурой β -бочонка (478-585 а.к. и 586-687 а.к.) (**Рис. 18**). Интересно, что молекула TGM2 имеет 5-6 дисульфидных мостиков, хотя большинство белков не способны образовывать S-S связи в цитозоле [89].

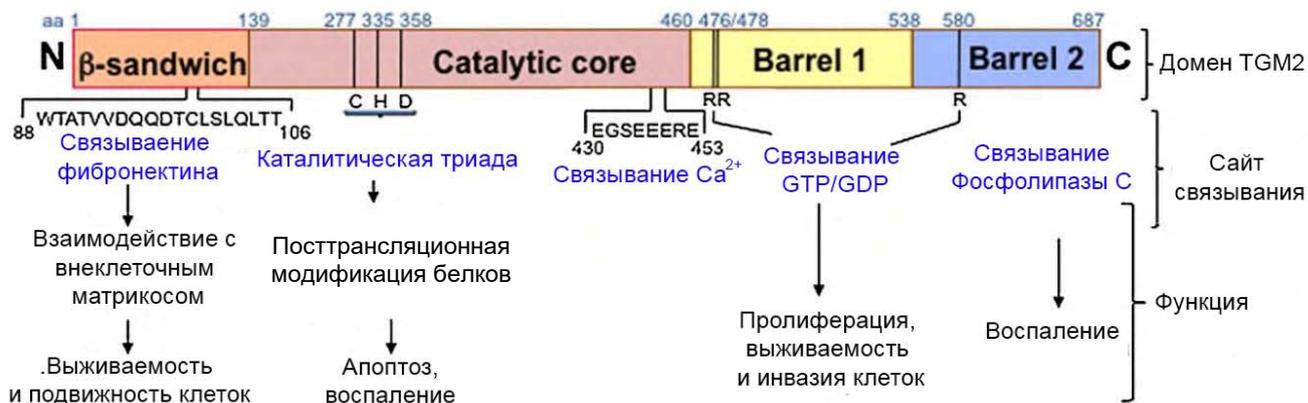


Рисунок 18. Схематическое изображение TGM2. Цветом выделены различные домены TGM2. Также на рисунке указаны предположительные функции различных участков этого белка [89].

Активный центр TGM2 состоит из каталитической триады Cys-His-Asp и дополнительного высоко консервативного триптофана, необходимого для стабилизации переходного состояния фермента. Механизм трансамидазной реакции заключается в нуклеофильной атаке тиольной группы цистеина активного центра на γ -карбоксильную группу донора, что приводит к образованию тиоэфирного промежуточного соединения. Далее ацильная группа этой молекулы переносится на аминогруппу второго субстрата. Лимитирующей стадией здесь является образование ацил-ферментного комплекса, ведущее к высвобождению аммония (**Рис. 19**) [90]. TGM2 может катализировать сразу несколько типов реакций, ведущих к посттрансляционной модификации белков по остатку глутамина: гомополимеризация или кросс-сшивание с образованием изопептидной связи между γ -карбоксамидной группой глутамина, входящего в состав пептида и ϵ -аминогруппой лизина также находящегося в составе пептида, кроме этого TGM2 может катализировать полиаминирование, приводящее к введению положительного заряда в структуру белка, или деамидирование, приводящее к увеличению отрицательного заряда из-за замены Q на E [91]. TGM2 обладает некоторой специфичностью к субстрату-донору глутамина и очень низкой специфичностью к субстрату-акцептору ацильной группы. Этот субстрат может быть, как ϵ -аминогруппой лизина, входящего в состав белка, так и первичным амином небольшой молекулярной массы. Механизм, по которому TGM2 выбирает свои субстраты до сих пор остаётся неясным. К настоящему моменту известно более 150 субстратов TGM2. Методом фагового дисплея было показано, что в позиции Q-1 TGM2 предпочитает полярные аминокислоты (70%). В позиции Q+1 никакой специфичности обнаружено не было, в позиции Q+2 TGM2 предпочитает пролин и чуть меньше треонин или серин. В позиции Q+3 TGM2 предпочитает алифатические радикалы в особенности лейцин (75%). Таким образом, консенсусная последовательность сайта взаимодействия TGM2 представляет собой pQX(P,T,S)L. Кроме того, сайты узнавания TGM2 должны находиться на

участках белка с неупорядоченной конформацией, что увеличивает доступность остатков глутамина [91].

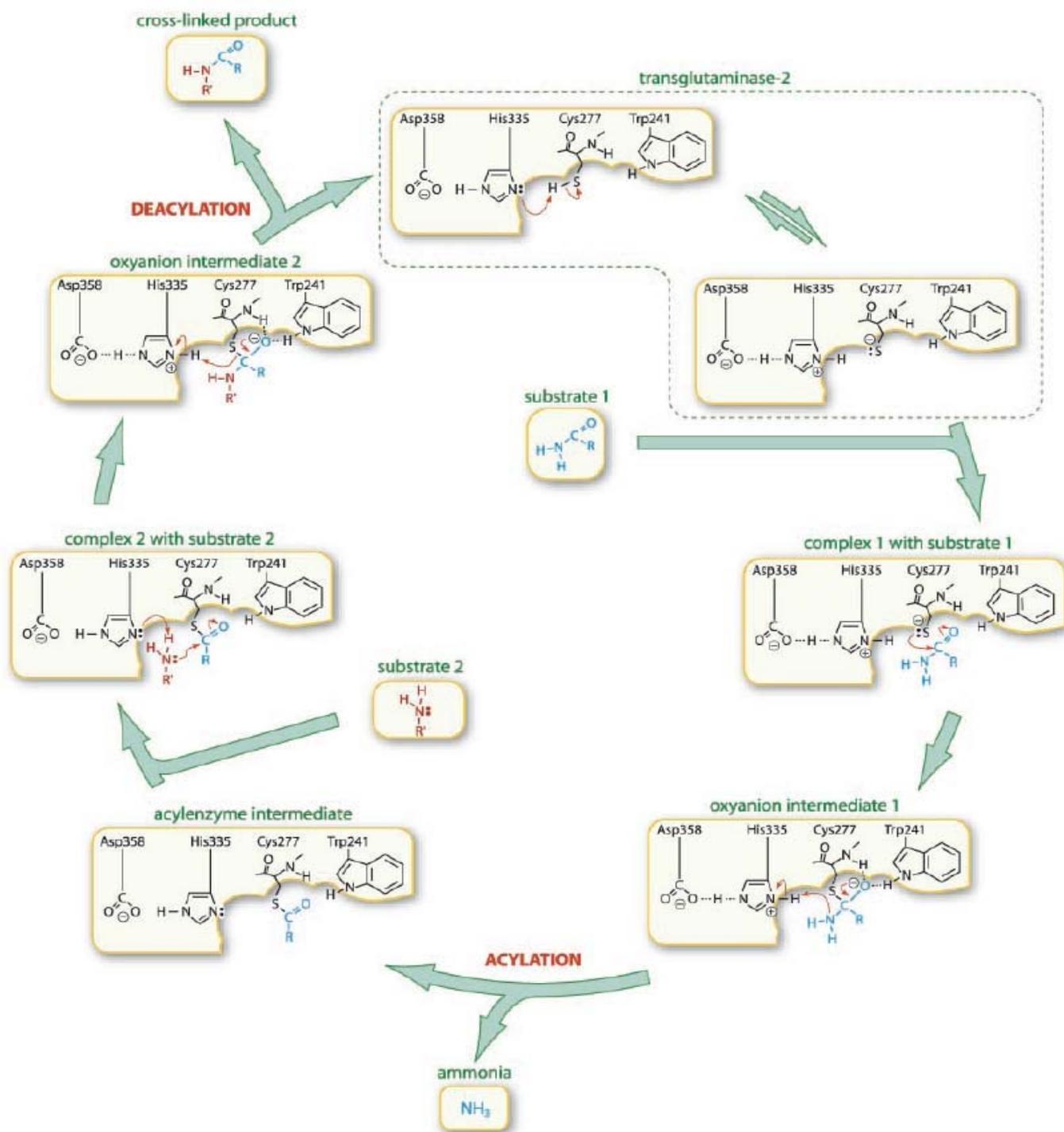


Рисунок 19. Механизм трансглутаминазной активности TGM2 [90].

Трансглутаминазная активность TGM2 определяется конформацией этого фермента. В отсутствие ионов Ca²⁺ активный центр TGM2 закрыт доменами 3 и 4 и поэтому не может взаимодействовать с субстратом (**Рис. 20**). При повышении концентрации Ca²⁺ происходит

связывание этого иона с четвёртой α -спиралью 2го домена, в результате чего эта спираль переходит в нефолдированную конформацию, что в свою очередь приводит к изменению структуры петли 455-478 а.к., соединяющей домены 2 и 3. В результате происходит отдаление доменов 3 и 4 друг от друга и открытие активного центра фермента для доступа субстрата [88].

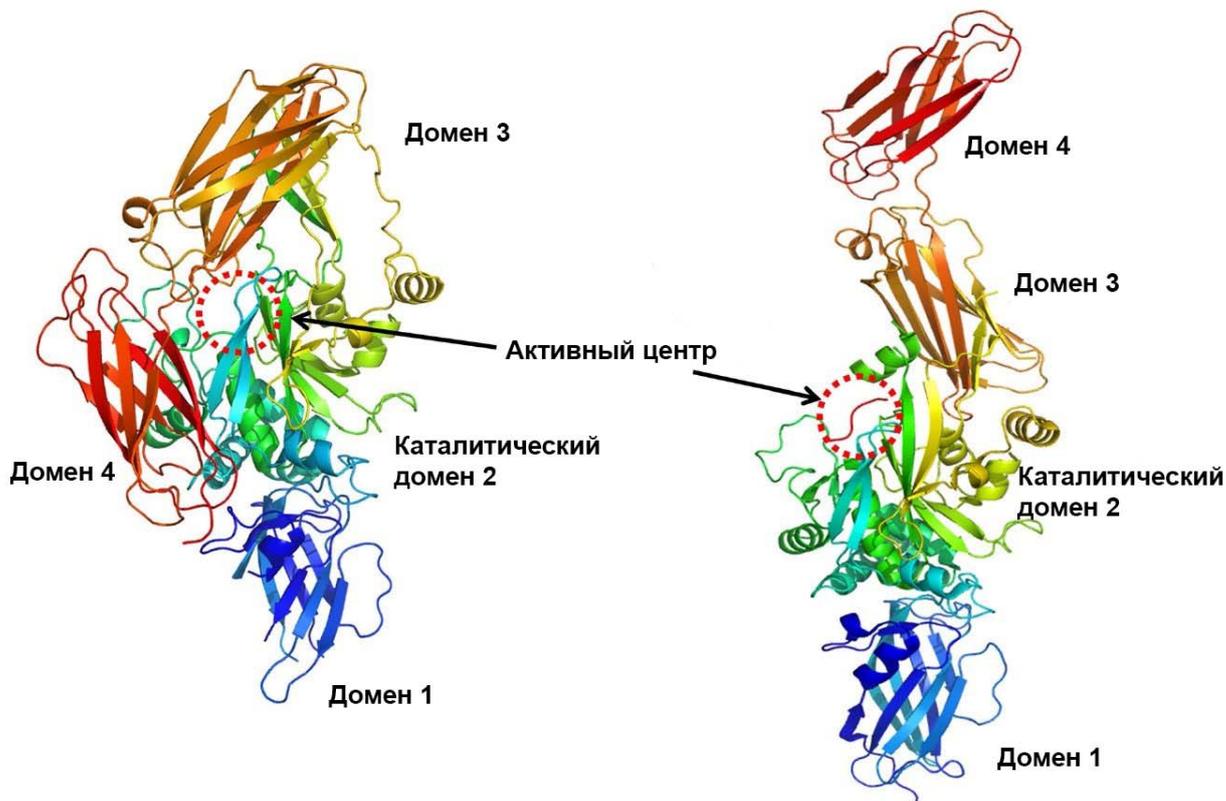


Рисунок 20. Активная (справа) и неактивная (слева) конформации TGM2 [92].

Помимо ионов кальция, важным регулятором TGM2 является GTP, который ингибирует её активность. Опыты *in vitro* показали, что даже при самых низких концентрациях GTP и самых высоких концентрациях Ca^{2+} , которые возможны при физиологических условиях внутри клетки, TGM2 находится полностью в неактивном состоянии. Однако имеются убедительные данные, свидетельствующие в пользу того, что в некоторых случаях TGM2 всё-таки активируется внутри клетки при нормальных условиях. Это может быть объяснено тем, что в клетках TGM2 существует в составе белкового комплекса общей массой от 150 до 600 кДа, и, скорее всего, регуляция активности TGM2 осуществляется белками, взаимодействующими с этим ферментом, по ещё не изученному механизму [89].

Отдельного внимания заслуживает локализация Трансглутаминазы 2 в клетке: часть молекул TGM2 находится во внеклеточном матриксе, другая часть ассоциирована с цитоплазматической мембраной с наружной стороны, третья часть связана с цитоплазматической

мембраной с внутренней стороны, кроме того более 50% TGM2 находится в цитозоле, межмембранном пространстве митохондрий и в ядре. Перемещение TGM2 в ядро происходит благодаря наличию у этого фермента двойной NLS, расположенной на участках 259-263 а.к. и 597-602 а.к. [93]. Механизм, по которому TGM2 транспортируется в митохондрии, до сих пор не известен, так как TGM2 не имеет последовательности митохондриальной локализации. Однако самой большой загадкой является механизм экспорта TGM2 из клетки. Было показано, что при перемещении во внеклеточное пространство TGM2 не проходит ни через аппарат Гольджи, ни через ЭПР и, вероятно, экспортируется из клетки по ещё не изученному неклассическому механизму. Это является логичным, так как большая концентрация Ca^{2+} в ЭПР могла бы привести к преждевременной активации TGM2 и массивной неспецифической кросс-сшивке всех белков, находящихся в ЭПР [88].

В каждом из перечисленных выше компартментов TGM2 выполняет свои особые функции (Рис. 21). Дело в том, что Трансглутаминаза 2 является необычайно многофункциональным белком и помимо кросс-сшивающей активности этот фермент проявляет GTP и АТР гидролазную активность, катализирует дисульфид изомеразную реакцию в белках с S-S связями, и кроме этого, TGM2 может выступать в роли протеинкиназы. Также во многих случаях TGM2, независимо от своей ферментативной активности, служит в роли каркаса для сборки сложных белковых комплексов [94].

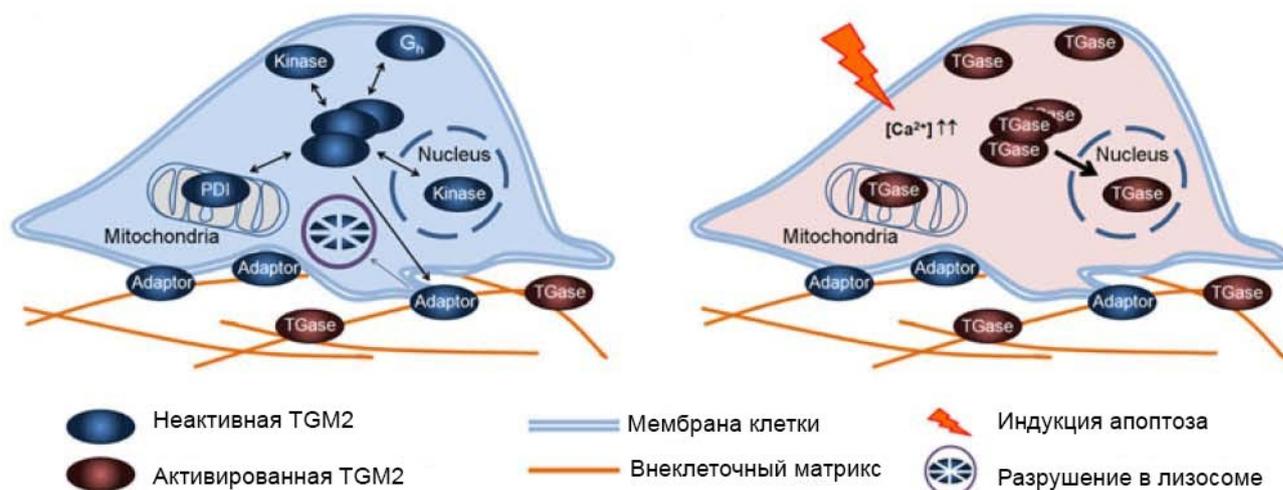


Рисунок 21. Схема, иллюстрирующая различные активности TGM2 в разных компартментах нормальной (слева) и апоптотической (справа) клетки [95].

В межклеточном пространстве TGM2 необходима для стабилизации внеклеточного матрикса. На наружной поверхности плазматической мембраны TGM2 находится в составе комплекса (1:1) с $\beta 1$, $\beta 3$, $\beta 5$ интегринами и работает как корецептор для прикрепления клеток к внеклеточному матриксу [89]. На внутренней поверхности мембраны TGM2 благодаря своей

GTPазной активности функционирует как G белок и участвует в передаче сигнала от $\alpha 1B/D$ адренергического рецептора к эффекторным белкам, таким как фосфолипаза C $\delta 1$ [89]. В ядре TGM2 участвует в формировании правильной структуры хроматина и стабилизации различных макромолекулярных комплексов, взаимодействующих с ДНК. Кроме того, TGM2 способна кросс-сшивать и фосфорилировать гистоны, что важно для регуляции экспрессии генов [96]. В межмембранном пространстве митохондрий TGM2 благодаря своей дисульфид изомеразной активности обеспечивает правильный фолдинг белков, располагающихся во внутренней мембране митохондрий. Так, например, TGM2 участвует в сборке I комплекса электрон-транспортной цепи митохондрий, а также фолдирует белок ANT1, осуществляющий обмен АТФ/АДР [97]. Наконец, в цитоплазме TGM2 играет важнейшую роль в регуляции апоптоза.

Как и многие другие белки регуляторы апоптоза TGM2 обладает одновременно и проапоптозными и антиапоптозными свойствами. С одной стороны, при индукции апоптоза TGM2 может полимеризовать белок Вах и придавать ему проапоптозную конформацию. Олигомеризация Вах приводит к образованию пор во внешней митохондриальной мембране и вызывает выход в цитоплазму таких проапоптозных белков как Цитохром С, Smac/DIABLO и АIF. С другой стороны, было показано, что высокий уровень экспрессии TGM2 наблюдается в наиболее агрессивных опухолях, таких как меланома, рак лёгкого, груди, поджелудочной железы и т.д.. TGM2 придаёт этим новообразованиям повышенную устойчивость к целому ряду важнейших противоопухолевых препаратов [89]. Механизм антиапоптозного действия TGM2 плохо изучен, однако было предположено, что TGM2 может образовывать кросс-сшивки между молекулами каспазы-3, и таким образом защищать клетки от гибели [98]. К сожалению, до сих пор не до конца понятно, на каких стадиях апоптоза происходит активация TGM2, и действительно ли именно кросс-сшивающая активность этого фермента важна для предотвращения гибели клетки.

Суммируя всю информацию, изложенную в этой главе, можно сказать, что запрограммированная смерть клеток — это крайне сложный и многостадийный процесс, на каждом этапе которого опухолевые клетки могут защищать себя от гибели с помощью разнообразных белков ингибиторов апоптоза. Механизм действия некоторых из этих белков уже изучен достаточно хорошо, про другие белки, напротив, известно крайне мало, однако в любом случае дальнейшие исследования в этой области имеют громадное значение, так как они позволят ответить на вопрос, почему раковые клетки способны столь легко противостоять любым терапевтическим воздействиям. Эти знания, в свою очередь, проложат путь к созданию новых более эффективных методов лечения онкологических заболеваний и продлят срок жизни пациентов.

2.2. Роль апоптоза в межклеточной коммуникации.

В предыдущей главе было описано несколько внутриклеточных механизмов, осуществляющих гибель клеток, однако, очень важно понимать, что сам процесс запрограммированной клеточной смерти не имеет смысла, если говорить о нём в контексте единичных клеток. Биологическая функция апоптоза заключается не в уничтожении клеток, а в обеспечении выживаемости и правильного развития организма в целом. Поэтому, на наш взгляд, наиболее интересным и важным является вопрос о том, какое влияние погибающие клетки оказывают на многоклеточный организм или, по крайней мере, на окружающую их ткань. Только недавно учёными были получены данные о важной роли межклеточных сигналов, продуцируемых погибающими клетками. Точных механизмов, по которому апоптотические клетки общаются со «здоровыми» клетками до сих пор предмет большого количества исследований и научных дискуссий, однако уже понятно, что такая коммуникация очень важна как для нормально развивающегося организма, так и для прогрессии и эволюции раковых опухолей.

2.2.1. Роль апоптоза в коммуникации нормальных клеток.

На протяжении десятилетий было известно, что апоптоз критически необходим для правильного развития организма. Наиболее очевидными примерами здесь являются исчезновение перемычек между пальцами у высших позвоночных, а также потеря хвоста головастика при превращении во взрослую лягушку. В перечисленных случаях роль апоптоза заключается в уничтожении «лишних» клеток. Эти два примера являются самыми простыми для понимания, однако они далеко не самые важные. Так уже более 20 лет известно, что при замыкании нервной трубки позвоночных животных происходит апоптоз небольшой популяции клеток, расположенных на вершине нервного валика (**Рис. 22А**). Было показано, что апоптотическая гибель этих клеток критически необходима для развития нервной системы, однако с точки зрения морфогенеза исчезновение небольшой популяции апикальных клеток совершенно необязательно для формирования нервной трубки. Второй похожий пример - это развитие мышц. Было показано, что при формировании мышечных волокон небольшая популяция миобластов подвергается апоптозу. Удивительно, но запрограммированная гибель этих клеток необходима для запуска слияния оставшихся миобластов в мышечные волокна (**Рис. 22Б**). В случае если ингибировать начало программы апоптоза, то слияния миобластов и образования мышечных волокон не происходит. В обоих случаях, описанных выше, апоптоз необходим для развития организма, однако его роль никак не связана с уничтожением небольшой группы «ненужных» клеток [99].

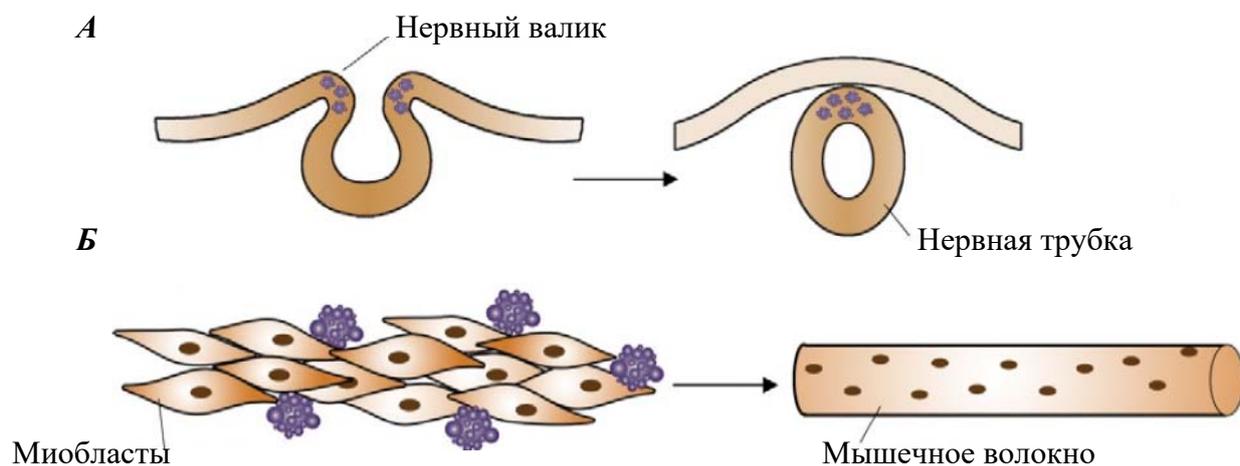


Рисунок 22. А - Схема формирования нервной трубки позвоночных. Б – схема формирования мышечных волокон. Апоптотические клетки обозначены фиолетовым цветом [99].

Изучение молекулярных механизмов этих и других сходных процессов позволило продемонстрировать, что в ходе апоптоза погибающие клетки выделяют межклеточные сигналы, оказывающие сильное воздействие на окружающую их ткань. Так, было показано, что в некоторых случаях апоптотические клетки секретируют важные ростовые факторы, такие как Wnt, SHH и BMP, ускоряющие пролиферацию близлежащих клеток. Такая пролиферация имеет большое значение для развития некоторых органов беспозвоночных, а также для восстановления повреждённых тканей. С другой стороны, существуют данные свидетельствующие в пользу того, что при некоторых обстоятельствах апоптотические клетки могут выделять и сигналы, вызывающие гибель соседних клеток. Так, например, при развитии дрозофилы апоптотические клетки, расположенные на одном участке имагинального диска, выделяют гомолог человеческого TNF α , приводящий к гибели клеток, находящихся в другой области диска. Аналогичный процесс был описан в волосяных фолликулах мыши [99].

Наиболее хорошо изучена роль апоптоза в процессе регенерации тканей. Давно известно, что при горизонтальном разрезании пресноводной гидры обе её части могут восстановить целое животное - верхняя часть сформирует «ногу», а нижняя часть отрастит «голову» (Рис. 23А). Удивительно, но механизм регенерации верхней и нижней частей этого кишечнополостного различается. Для регенерации «головы» требуется активация апоптоза, а для регенерации «ноги», напротив, необходимо отсутствие апоптотических клеток. Если же в верхней части животного (той части, которая должна регенерировать «ногу») искусственно вызвать апоптоз, то произойдёт формирование второй «головы» и в итоге получится гидра с двумя «головами», но без «ног». Было показано, что регенерация «головы» запускается с помощью белка Wnt3, выделяемого апоптотическими клетками. Другим интересным примером является регенерация печени.

Недавние работы продемонстрировали, что апоптотические клетки печени секретируют простагландин Е, который стимулирует пролиферацию стволовых клеток и ускоряет восстановление повреждённого органа (**Рис. 23Б**) [99].

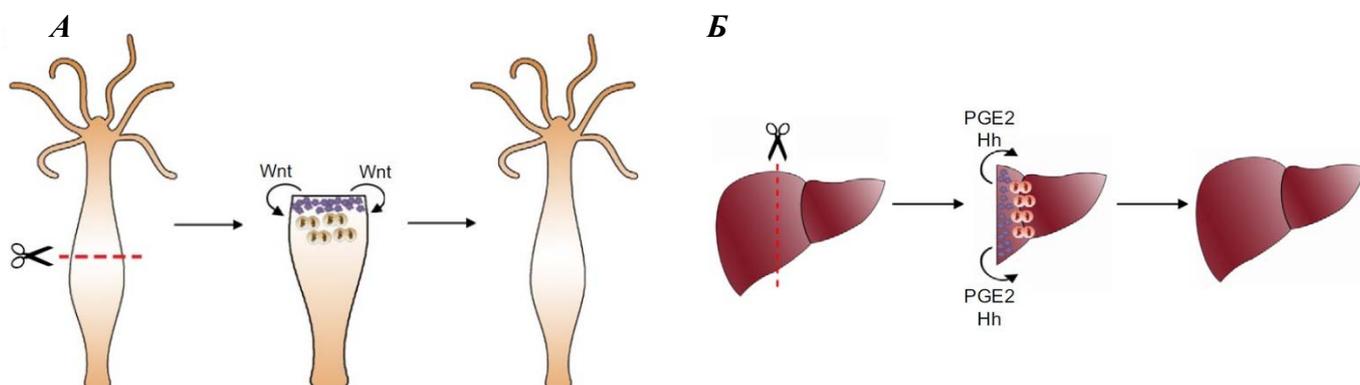


Рисунок 23. А - схема регенерации ноги пресноводной гидры. Б – схема регенерации печени мыши. Апоптотические клетки обозначены фиолетовым цветом [99].

Другим интереснейшим примером взаимодействия между погибающими и «здоровыми» клетками является коммуникация аксона, отрезанного от тела нейрона, с окружающими его глиальными (Шванновскими) клетками. Необходимо подчеркнуть, что аксон является лишь частью нервной клетки, и поэтому невозможно говорить об «апоптозе аксона», однако тем не менее биологический смысл этого процесса может быть схожим с описанными выше механизмами регенерации.

Известно, что аксон, отделённый от нейрона может нормально существовать на протяжении нескольких недель и даже иногда регенерировать, восстанавливая свою связь с основным телом нейрона. Этот факт выглядит особенно удивительным, если вспомнить о том, что в аксоне отсутствует ядро, без которого невозможен запуск никаких генетических программ. Более того, без ядра аксон не может получать ни новых молекул мРНК, ни новых рибосом, что критически важно для существования клетки. Однако детальные исследования показали, что с течением времени количество рибосом в аксоне, отрезанном от тела нейрона, не только не сокращается, а наоборот, увеличивается более чем в 10 раз! Откуда и каким образом аксон получает такое количество новых рибосом? Аккуратное изучение этого вопроса продемонстрировало, что дополнительные рибосомы попадают в аксон нейрона из окружающих его Шванновских клеток (**Рис. 24**). Такой транспорт осуществляется с помощью мембранных пузырьков – везикул, секретируемых Шванновскими клетками и захватываемых аксоном. Эти везикулы доставляют в аксон группы рибосом, собранные на молекулах мРНК (полисомы).

Интересно отметить, что данный вид транспорта, судя по всему, является специфичным, так как от Шванновских клеток к аксону передаются именно рибосомы, но не другие белки, обильно присутствующие в самих Шванновских клетках [100, 101].

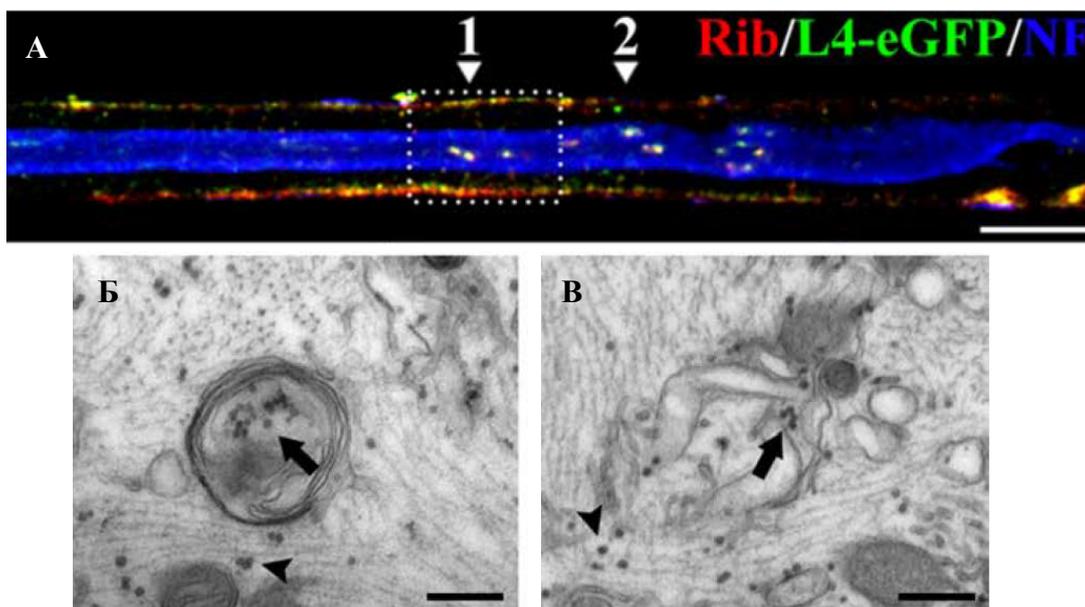


Рисунок 24. Транспорт рибосом от Шванновских клеток к аксонам. *А* – На микрофотографии видны Шванновские клетки (жёлтые), обёртывающие аксон (синий). Аксон был отделён от тела нейрона (имитация повреждения аксона), а Шванновские клетки трансдуцированы вирусом, кодирующим рибосомальный белок L4 с GFP на его C-конце (зелёный). После этого клетки были окрашены антителами к рибосомальному белку (красный). В аксоне видны белые точки (наложение зелёной, синей и красной флуоресценции) – рибосомы, попавшие в аксон из Шванновской клетки. *Б* – электронная микрофотография, показывающая везикулу, эндоцитированную аксоном, внутри везикулы видны рибосомы. *В* – при слиянии везикулы с мембраной эндосомы рибосомы из везикулы попадают в цитоплазму [100].

Таким образом, повреждение аксона по ещё не известному механизму стимулирует в Шванновских клетках секрецию везикул, содержащих рибосомы. Эти везикулы захватываются аксоном и позволяют ему выжить при отделении от тела нейрона. Всё это демонстрирует новый и интересный механизм бинаправленной коммуникации повреждённых и «здоровых» клеток.

Суммируя всё вышеизложенное, можно сказать, что за последние 5-10 лет было обнаружено большое количество примеров того, как апоптотические клетки влияют на соседние «здоровые» ткани, однако молекулярный механизм большинства из этих процессов до сих пор остаётся загадкой и поэтому требует дальнейшего исследования.

2.2.2. Роль апоптоза в коммуникации опухолевых клеток.

Высокая агрессивность и приспособляемость злокачественных опухолей связана с тем, что раковые клетки легко могут подстраивать и использовать молекулярные механизмы, в норме предназначенные для увеличения выживаемости всего организма, для своих собственных целей. Апоптоз в данном случае не является исключением. Многими авторами было сделано парадоксальное, на первый взгляд, наблюдение о том, что большое количество апоптотических клеток в опухоли коррелирует с более агрессивным фенотипом новообразования и плохим прогнозом для выживаемости пациентов [102-104]. Истинный смысл этих результатов стал понятен лишь совсем недавно, когда учёные обнаружили многочисленные механизмы, по которым апоптотические клетки способны ускорять пролиферацию и миграцию выживших клеток.

Неудачи в лечении рака во многом объясняются тем, что лекарственные препараты хотя и убивают большую часть опухолевых клеток, однако в итоге оказываются малоэффективными, так как небольшое количество раковых клеток неизбежно выживает после терапии и быстро восстанавливает опухоль до первоначального размера. Более того, образовавшаяся вторичная опухоль часто демонстрирует гораздо более агрессивные свойства по сравнению с исходной. С недавних пор основной причиной такого явления считают сигналы, продуцируемые раковыми клетками, подвергающимися апоптозу под действием химио- и радиотерапии. Этот феномен получил название «компенсаторная пролиферация».

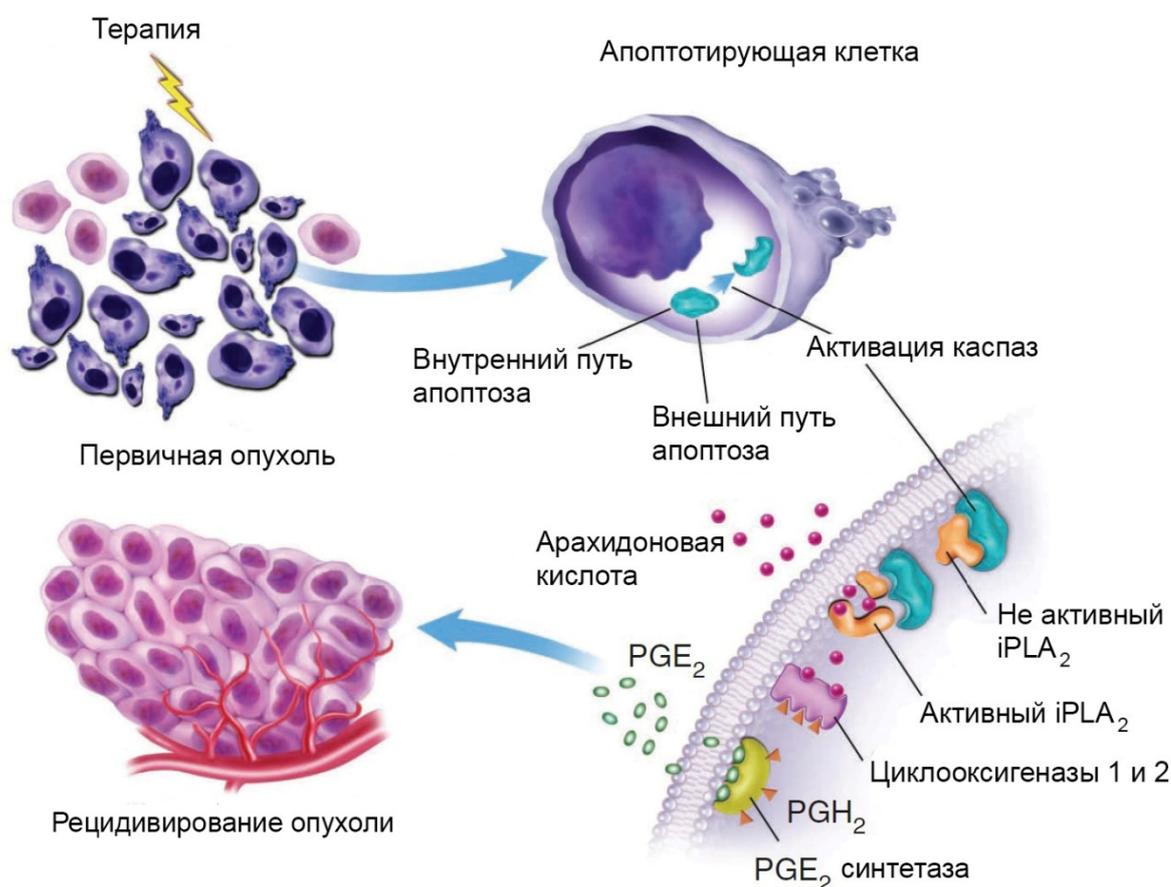


Рисунок 25. Предполагаемый механизм, с помощью которого апоптотические опухолевые клетки стимулируют пролиферацию выживших клеток после терапии. В данном случае процесс запускается при активации каспазы-3 и -7, а основной эффекторной молекулой является простагландин E₂ (PGE₂) [102].

По-видимому, существует несколько дополняющих друг друга молекулярных механизмов, по которым умирающие опухолевые клетки способны стимулировать пролиферацию и устойчивость к терапии в выживших клетках. Один из таких путей был описан в работе Хуанга и соавторов. Учёные продемонстрировали, что каспаза-3, активирующаяся в раковых клетках, погибающих под действием терапии, расщепляет фосфолипазу iPLA₂. Протеолитическое расщепление приводит к активации этого фермента и продукции арахидоновой кислоты, которая в последствии превращается в простагландин E₂, экспортируемый из клеток. Далее, простагландин E₂, взаимодействует со своим рецептором (EP₂) на поверхности соседних выживших опухолевых клеток, что в итоге активирует их пролиферацию (**Рис. 25**) [102].

Сходный механизм был продемонстрирован Ченгом и коллегами. В своей работе авторы показали, что каспаза-3 расщепляет и активирует киназу PKCδ. Далее эта киназа фосфорилирует белки АКТ и p38 MAPK, что в конечном итоге приводит к выбросу из погибающих клеток различных ростовых факторов белковой природы таких как VEGF (Vascular endothelial growth factor – фактор роста сосудов). Важно отметить, что VEGF не только стимулирует пролиферацию самих раковых клеток, но и индуцирует рост новых кровеносных сосудов к опухоли, что с одной стороны увеличивает её снабжение питательными веществами, а с другой стороны повышает шанс возникновения метастазов [104].

В предыдущих двух примерах были описаны механизмы, напрямую связанные с активностью каспазы-3, однако молекулярная программа компенсаторной пролиферации может быть и более сложной. Так в работе Обенауф было показано, что действие противоопухолевых препаратов приводит к понижению экспрессии транскрипционного фактора FRA1 в погибающих, но не в выживших клетках. Уменьшение уровня FRA1 вызывает повышение экспрессии и секреции таких важных белковых ростовых факторов как IGF1, EGF, ANGPTL7 и PDGFD, которые ускоряют пролиферацию выживших клеток [103].

Суммируя данные приведённые выше, можно сказать, что на сегодняшний день опубликовано несколько работ, описывающих молекулярные механизмы компенсаторной пролиферации. Этот процесс был обнаружен в таких опухолях как рак молочной железы [102], рак поджелудочной железы [104], аденокарцинома лёгкого [103] и меланома [103]. Медиаторами

компенсаторной пролиферации могут являться молекулы как белковой, так и липидной природы. Однако изучение данного процесса в целом находится лишь в самом начале. По этой причине необходимы дальнейшие исследования для понимания роли компенсаторной пролиферации в развитии злокачественных новообразований. Кроме того, очевидна необходимость разработки новых методов лечения раковых опухолей, которые бы позволили или предотвратить, или ингибировать компенсаторную пролиферацию после терапии.

2.3. Глиобластома.

В предыдущей главе была описана роль апоптоза в развитии нормального организма, а также роль апоптоза в опухолях, подвергшихся терапии. Однако, каково значение апоптоза для естественного (то есть в отсутствии лечения) развития опухоли? Выше упоминалось, что большое количество апоптотических клеток в опухолях до лечения коррелирует с плохим прогнозом для выживаемости пациентов с различными видами рака. Однако, на этом наши знания о роли апоптоза в развитии злокачественных новообразований исчерпываются. Нет совершенно никаких данных о том, как высокий, в сравнении с нормальными тканями, уровень апоптоза в опухолевой ткани влияет на её изменчивость и эволюцию. Понятно, что роль апоптоза в различных типах опухолей будет разной. Например, при раке крови, влияние апоптотических опухолевых клеток на «здоровые» опухолевые клетки скорее всего будет минимально, так как раковые клетки распределены по кровотоку, и все факторы, секретируемые ими, мгновенно разбавляются постоянно циркулирующей кровью человека. С другой стороны, в солидных опухолях роль апоптоза может быть намного выше, так как раковые клетки постоянно контактируют друг с другом, а молекулы, секретируемые ими, почти не удаляются из опухоли из-за слабого кровоснабжения.

Опухолью, в развитии которой апоптоз может играть наибольшую роль, является глиобластома (GBM). Главной отличительной чертой этого новообразования служит обширная некротическая зона с большим количеством апоптотических клеток (**Рис. 26**). Обильно гибнущие клетки появляются задолго до момента хирургического удаления опухоли вследствие недостатка питательных веществ, крайне ограниченного пространства для роста опухоли, а также очень быстро увеличивающейся клеточной массы.

2.3.1. Клинические особенности глиобластомы.

Глиобластома является наиболее распространённой и агрессивной первичной опухолью головного мозга у взрослых пациентов. Несмотря на громадные усилия, направленные на борьбу

с этим заболеванием, за последние 30 лет не было достигнуто никакого значимого прогресса в лечении глиобластом. До сих пор пятилетняя выживаемость пациентов с GBM не превышает 2% [105], а существующие методы терапии в основном носят лишь паллиативный характер. Единственным по-настоящему эффективным способом лечения глиобластомы является максимальное хирургическое удаление опухоли с последующей радиотерапией. Это позволяет увеличить среднюю продолжительность жизни больных с 3 месяцев до одного года. В качестве химиотерапии глиобластомы широко используется лишь один противоопухолевый препарат – ДНК алкилирующий агент темозоломид (TMZ), который, однако, повышает среднюю выживаемость пациентов с 12 до 14 месяцев и поэтому является крайне малоэффективным [106].

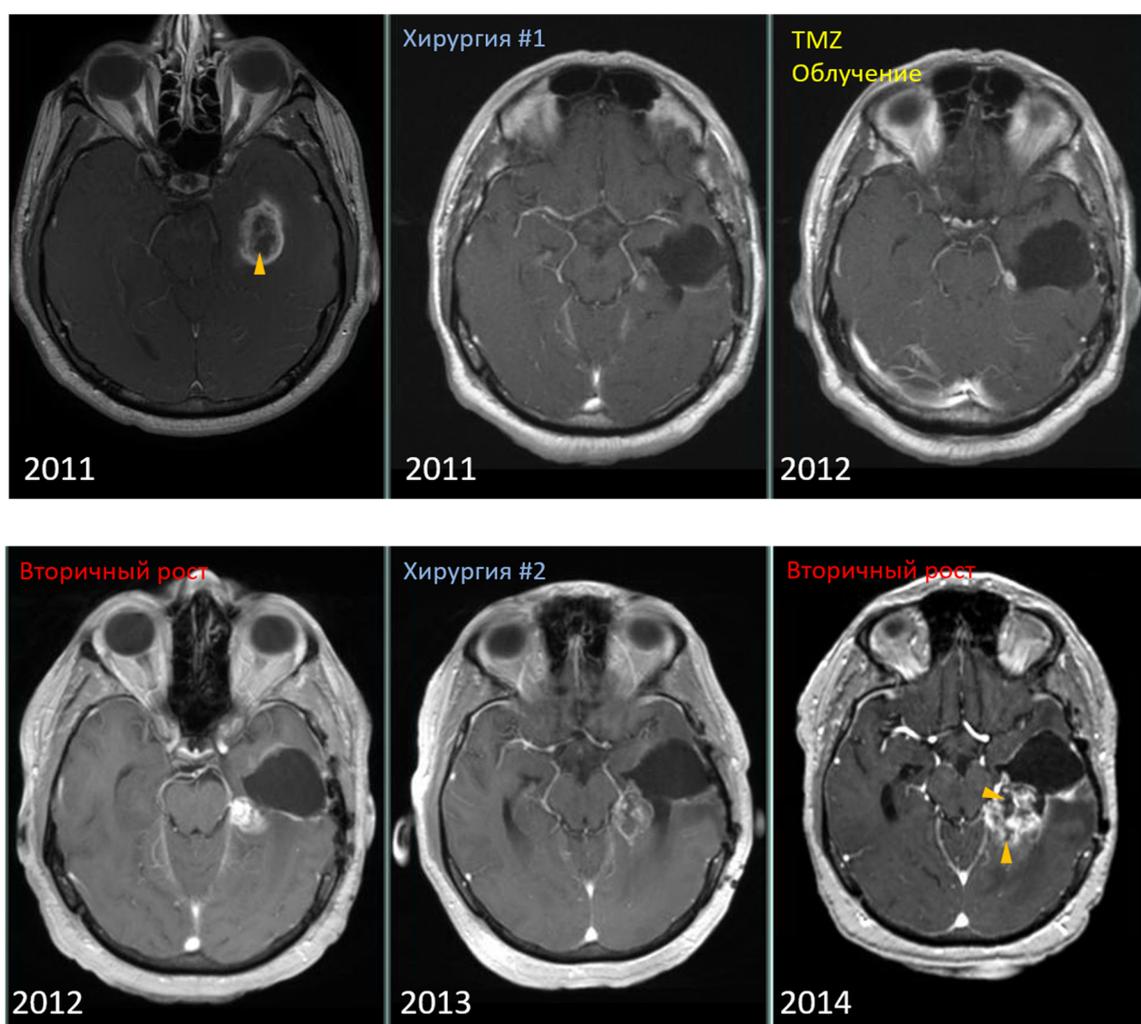


Рисунок 26. Типичная картина развития глиобластомы. На рисунке представлены данные магнитно-резонансной томографии (МРТ) головного мозга пациента, полученные нами с 2011 по 2014 год. Показаны снимки первоначальной опухоли, опухоли после хирургического удаления, опухоли после терапии с использованием темозоломида (TMZ) и γ -излучения, а также снимки рецидивов опухоли. Жёлтой стрелкой обозначена некротическая зона (тёмного цвета) в центре опухоли.

Как видно из медицинского названия опухоли (мультиформная глиобластома; glioblastoma multiforme; GBM), отличительной особенностью этого типа новообразований является чрезвычайная гетерогенность, которая является одной из основных причин, затрудняющих лечение. Эта гетерогенность наблюдается как между различными опухолями, так и между участками внутри одной опухоли или между образцами, полученными от одного и того же пациента на разных стадиях лечения [107]. Неоднородность присутствует фактически на всех уровнях организации клеток, начиная от генома и эпигенома и заканчивая транскриптомом и протеомом. Причём удивительным фактом является то, что гетерогенности, наблюдаемые на разных уровнях, слабо коррелируют друг с другом. Другими словами, клетки глиобластомы можно разбить на хорошо выраженные группы по уровню экспрессии генов, однако эти группы будут мало совпадать с группами, разделёнными в которых основано на метилировании или мутациях ДНК, а также с группами, разбитыми по степени чувствительности опухолей к терапии.

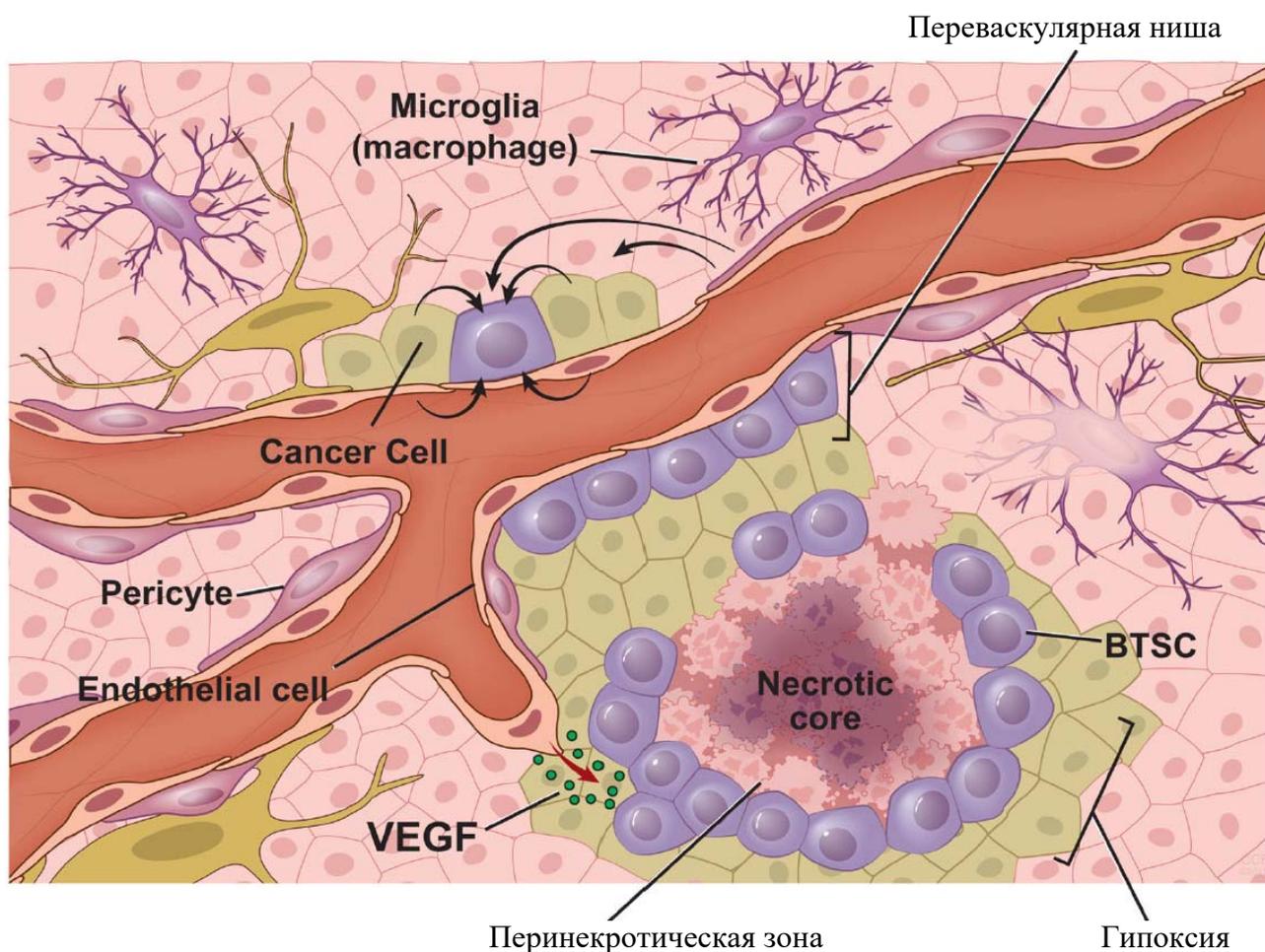


Рисунок 27. Схематическое изображение различных зон глиобластомы. На рисунке обозначена некротическая зона, микроглия, эндотелиальные клетки, нормальные клетки мозга и стволовые клетки глиобластомы (GSC; BTSC) [108].

Высокий вклад в создание гетерогенности глиобластом вносят различные условия микроокружения раковых клеток, а также иерархическая организация самой опухоли (**Рис. 27**). Говоря о микроокружении нужно отметить, что существует как минимум 3 принципиально отличающихся зоны опухоли. В центре располагается обширная некротическая зона, в которой раковые клетки находятся в условиях гипоксии, недостатка питательных веществ, $pH \approx 5.9$ и избытка продуктов метаболизма соседних опухолевых клеток [109]. По периметру опухоли находится зона микроваскулярной пролиферации, в которой вновь сформированные сосуды и капилляры активно снабжают раковые клетки кислородом и питательными веществами. Наконец, за видимыми границами опухоли располагаются многочисленные инфильтрированные раковые клетки, на которые большое влияние оказывают молекулы, секретированные нормальными клетками мозга человека [108]. Такие разнообразные условия способствуют тому, что в перечисленных выше зонах опухоли присутствуют клетки с разными фенотипами и различным набором закреплённых в ходе естественного отбора мутаций. Такой большой репертуар субпопуляций раковых клеток, постоянно присутствующих в опухоли, сводит на нет возможность одновременного уничтожения всех этих клеток с помощью одного метода терапии.

Другой важнейший фактор создания гетерогенности — это сама природа глиобластомы. Дело в том, что глиобластома является иерархически организованной опухолью. То есть, в ней присутствуют стволовые раковые клетки (GSC), способные к самообновлению, а также к дифференцировке во все другие типы опухолевых клеток. Эти клетки обязательно содержатся в любой опухоли, однако основную массу новообразования составляет широкий спектр более дифференцированных клеток. Эти клетки часто демонстрируют ускоренную пролиферацию, однако они не способны восстанавливать опухоль *in vitro* и *in vivo*. Исследования показали, что главными маркерами GSC являются белки CD133 или ALDH1A3, в то время как более дифференцированные клетки характеризуются высокой экспрессией белка GFAP. В настоящее время предполагается, что именно GSC ответственны за рецидивированные глиобластомы после терапии [110].

Иерархическая организация GBM существенно осложняет исследование этой опухоли. Было показано, что при культивировании клеток глиобластомы в стандартных условиях *in vitro* уже в течение первых нескольких пассажей происходит образование гомогенной популяции клеток, которые и по фенотипу, и по экспрессии генов очень сильно отличаются от исходной опухоли (**Рис. 28А**). По этой причине, данные, полученные на таких клеточных культурах, будут крайне мало отражать реальное поведение GBM. Для того чтобы избежать подобных артефактов в исследованиях глиобластомы необходимо использовать первичные культуры опухолевых клеток, полученных от пациентов. Более того, эти клетки следует культивировать в виде

нейросфер (Рис. 28Б) на специальной безсывороточной среде, содержащей рекомбинантные факторы роста. Такие условия позволяют максимально приблизить фенотип клеток, выращиваемых *in vitro*, к первоначальному фенотипу опухоли *in vivo* (Рис. 28В) [111].

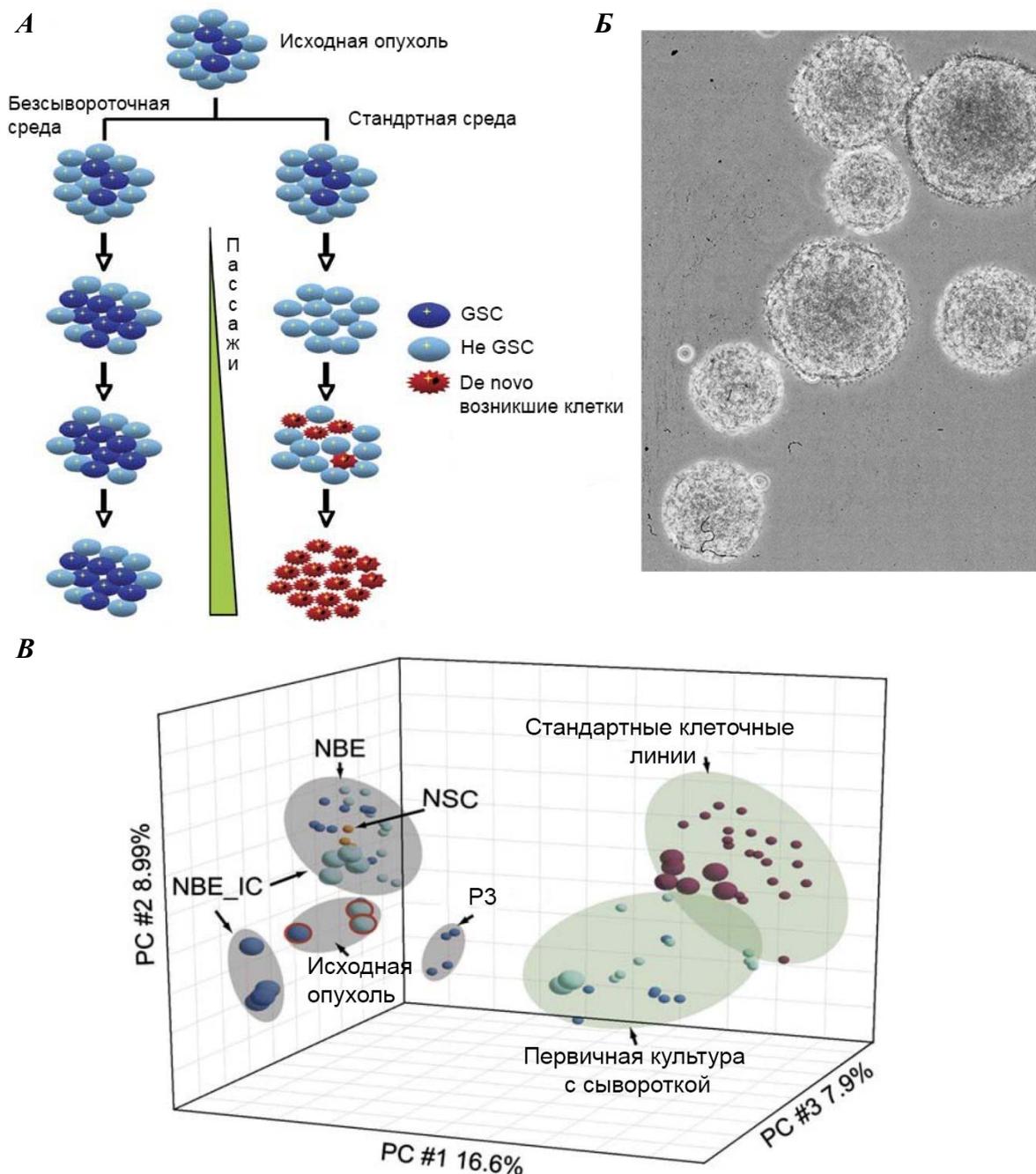


Рисунок 28. Культивирование клеток глиобластомы *in vitro*. А – схематическое изображение изменений клеток глиобластомы, возникающих в ходе культивирования в безсывороточной среде с ростовыми факторами (слева) и в стандартной среде с сывороткой (справа). Синим обозначены GSC; голубым обозначена более дифференцированная популяция клеток глиобластомы; красным обозначены клетки, видоизменённые вследствие условий культивирования *in vitro*. Б – фотография нейросфер глиобластомы, выращиваемых *in vitro*. В -

анализ экспрессии генов методом принципиальных компонент в различных клетках глиобластомы. Обозначены исходные опухоли пациентов; нормальные нейрональные стволовые клетки (NSC); первичные культуры клеток глиобластомы, выращиваемые на бессывороточной среде (NBE); ксенотрансплантаты первичных культур клеток глиобластомы в мозге иммунодефицитных мышей (NBE_IC); первичные культуры клеток глиобластомы, выращиваемые на среде с сывороткой в течение 3х пассажей (p3); первичные культуры клеток глиобластомы, выращиваемые на среде с сывороткой в течение более 20ти пассажей; стандартные клеточные линии глиобластомы выращиваемые на среде с сывороткой [111].

2.3.2. Классификация глиобластом.

Выше было описано несколько факторов, ответственных за возникновение гетерогенности в пределах одной опухоли, однако существенная гетерогенность наблюдается и между опухолями, полученными от разных пациентов. По этой причине уже более 10 лет учёными всего мира ведутся интенсивные попытки разбить глиобластомы на группы, характеризующиеся разным поведением опухоли и различной выживаемостью больных.

В настоящее время предполагается, что существует два принципиально разных молекулярных механизма возникновения глиобластом (**Рис. 29**). В 90% случаев глиобластома возникает спонтанно сразу как рак IV стадии. Эти опухоли содержат большое количество изменений наследственного материала, однако мутаций, которые бы присутствовали у большинства пациентов и были бы обязательным условием формирования опухоли, обнаружить не удалось. В оставшихся 10% случаев глиобластома развивается из астроцитомы II-III стадий на протяжении длительного времени. Такие глиобластомы называют вторичными. Важно отметить, что вторичные и первичные глиобластомы сильно отличаются друг от друга по фенотипу и для вторичной глиобластомы характерен гораздо более благоприятный прогноз течения заболевания по сравнению с первичной опухолью [112].

Началом опухолевой трансформации, ведущей к образованию вторичной глиобластомы, является точечная мутация в гене IDH. Эта мутация затрагивает первый или второй нуклеотид триплета, кодирующего 132ю аминокислоту белка, и более чем в 90% случаев вызывает замену аргинина на гистидин (R132H). Такая аминокислотная замена является так называемой «gain of function mutation», то есть приводит к появлению новой функции у белка. Белок IDH представляет собой фермент цикла Кребса и в норме осуществляет реакцию по превращению изоцитрата в α -кетоглутарат с образованием молекулы NADPH. Однако, мутация R132H приводит к тому, что IDH начинает катализировать реакцию перехода α -кетоглутарата в D-2-гидроксиглутарат (2-HG) (**Рис. 30**) [113].



Рисунок 29. Схема возникновения первичных и вторичных глиобластом [113].

Мутация IDH почти в 100 раз повышает количество 2-HG в клетках. Более того, в норме 2-HG присутствует в виде L изомера, тогда как мутантный IDH катализирует появление D изомера (**Рис. 30**). 2-HG ингибирует сразу несколько ферментов, управляющих структурой хроматина, в том числе деметилазы гистонов. Всё это вызывает избыточный уровень метилирования гистонов и ДНК и блокирует экспрессию генов, участвующих в дифференцировке клеток [114], что в свою очередь и является первым этапом возникновения опухолевой ткани.

Очень важно отметить, что на сегодняшний день предполагается, что не существует первичных глиобластом с мутацией в гене IDH, и также не существует вторичных глиобластом без этой мутации. Небольшое количество (< 5%) случаев всё-таки описанных в литературе сейчас объясняют несвоевременной постановкой диагноза или ошибками при сборе и анализе образцов биопсии пациентов.

Поскольку первичные глиобластомы составляют около 90% от всех глиобластом, то эта большая группа в свою очередь подразделяется учёными на несколько более мелких субтипы.

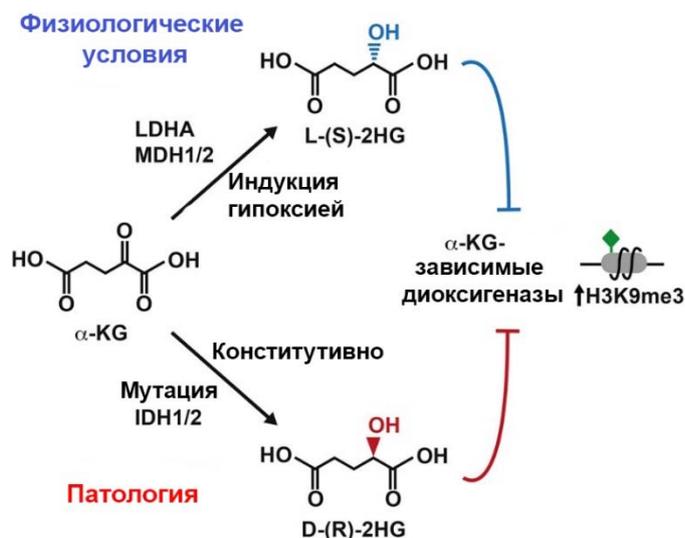


Рисунок 30. Схема возникновения L-2HG в физиологических условиях и D-2HG при мутации в гене IDH. Оба соединения повышают уровень метилирования гистонов, однако D-2HG производится в концентрациях в десятки раз больших чем концентрации L-2HG [114].

Окончательно устоявшейся классификации первичных глиобластом на сегодняшний день не существует, и поэтому разными авторами предположены различные варианты разделения этих опухолей на группы. Наиболее часто глиобластомы делят, основываясь на глобальном уровне экспрессии генов, определённом или с помощью технологии микрочипов или благодаря секвенированию транскриптома. Так некоторые авторы выделяют два фенотипа глиобластом (пронейрональный и мезенхимальный [110]), другие три (пронейрональный, мезенхимальный и пролиферативный [115]), и, наконец, в некоторых работах предложено разделение на четыре группы (пронейрональный, мезенхимальный, классический и нейрональный [116]). Общим для всех этих классификаций является то, что пронейрональные глиобластомы характеризуются наилучшим прогнозом для выживаемости пациентов, в то время как мезенхимальные, напротив, являются наиболее агрессивными. Для каждой из этих групп характерны свои мутации ДНК, однако не существует мутаций, которые бы позволяли однозначно определить принадлежность опухоли к той или иной группе. Исключением здесь является мутация гена IDH во вторичных (менее агрессивных) глиобластомах. Так было показано, что все опухоли с этой мутацией относятся исключительно к пронейрональному фенотипу [113].

Недавние работы, использующие технологию секвенирования транскриптома единичных клеток, показали, что в большинстве опухолей присутствуют клетки сразу нескольких фенотипов, и высокое разнообразие представленных фенотипов раковых клеток коррелирует с плохим прогнозом для выживаемости пациентов с глиобластомой [117]. В нашей лаборатории мы подтвердили эти данные, продемонстрировав, что при анализе большого фрагмента опухоли (более 1 см диаметром) можно обнаружить скопления клеток с разными фенотипами, а также участки глиобластомы почти полностью состоящие из апоптотических клеток (**Рис. 31**).

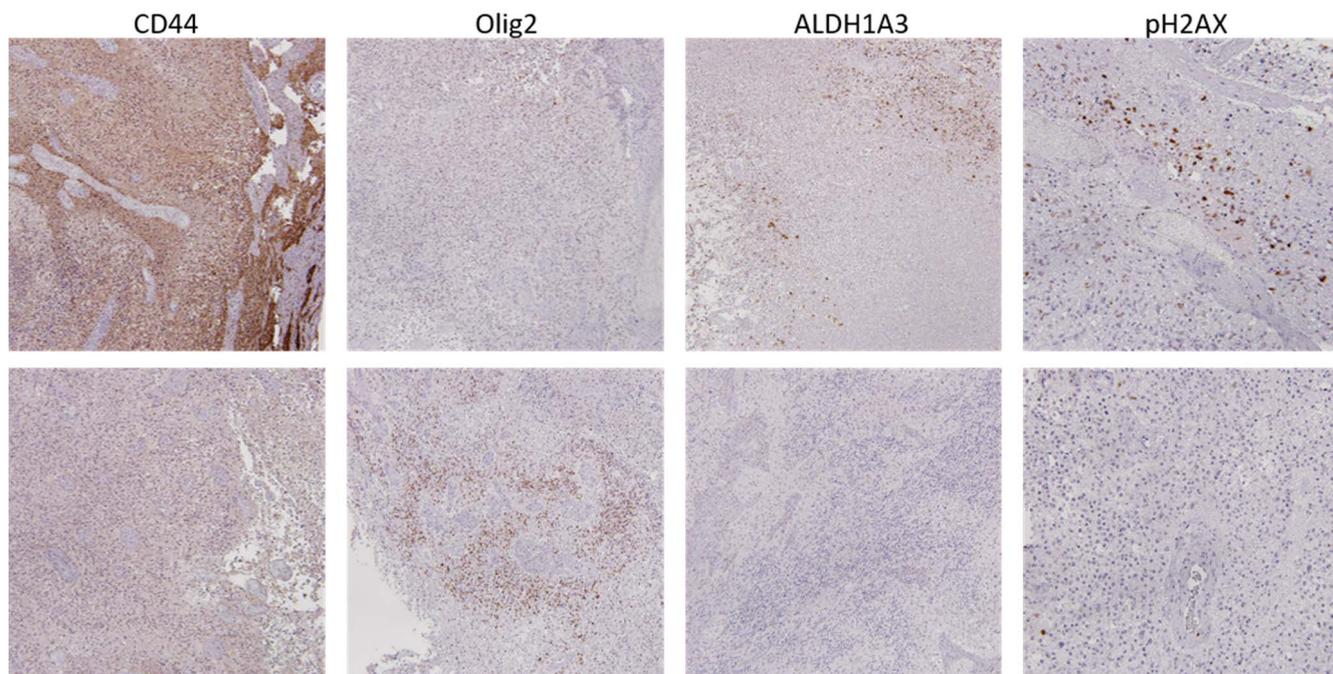


Рисунок 31. Внутриопухолевая фенотипическая гетерогенность глиобластом. Срезы одной и той же опухоли были окрашены антителами к CD44 и ALDH1A3 (маркёры мезенхимального фенотипа), Olig2 (маркёр пронеуронального фенотипа) и к фосфорилированному гистону H2AX (маркёр апоптотических клеток). Сверху представлена более мезенхимальная часть опухоли, снизу более пронеурональная часть опухоли.

2.3.3. Эволюция глиобластомы.

Глиобластома крайне гетерогенна не только в пространстве, как было описано выше, но и во времени. Эта опухоль обладает высокой изменчивостью и способна легко перестраивать свой фенотип и быстро развивать резистентность к терапии. К сожалению, опубликовано лишь несколько статей, посвященных развитию и эволюции GBM, и ни в одной из них не содержится деталей о молекулярном механизме данного процесса.

Об эволюции IDH мутантных опухолей было коротко рассказано выше, однако они составляют лишь 10% от общего количества глиобластом и являются сравнительно мало агрессивными. По этой причине существенно больший интерес представляет развитие первичных GBM.

Компьютерный анализ данных секвенирования ДНК пациентов с первичной глиобластомой и последующие опыты с мышиными моделями *in vivo* показали, что первым событием в формировании первичной глиобластомы является амплификация 7ой хромосомы с образованием 3 и более её копий, а также потеря одной копии 10ой хромосомы. Это приводит к амплификации гена PDGFR α (расположен на 7ой хромосоме) и частичной потере гена PTEN (расположен на 10ой хромосоме). Вероятно, этих двух событий достаточно для формирования

опухоли proneйронального фенотипа. Далее может происходить мутация в гене TP53 и/или потеря гена CDKN2A. Это приводит к дополнительному закреплению опухолевого перерождения клеток. Следующие события могут или способствовать дальнейшей proneйрональной трансформации, как, например, дополнительная амплификация PDGFR α , или же могут вызывать переход опухоли в другой фенотип. Так, например, мутации в гене EGFR являются характерным признаком классического фенотипа глиобластом, а потеря NF1 приводит к приобретению мезенхимального фенотипа. Таким образом, описанная выше модель предполагает, что глиобластомы появляются с proneйрональными характеристиками и далее в процессе эволюции могут или сохранять их или приобретать другой фенотип [118].

Однако эта гипотеза имеет два существенных ограничения. Во-первых, здесь описана лишь модель наиболее частого развития событий при формировании глиобластом. Ни одна из упомянутых мутаций по отдельности и ни одна из их комбинаций не является строго обязательной для формирования опухоли именно такого фенотипа. То есть, существует значительное количество примеров, когда глиобластомы не имеют ни одной из перечисленных выше мутаций, или наоборот, имеют мутации, характерные для одного фенотипа, а на деле обладает другим фенотипом. Во-вторых, работы, проводимые в нашей и других лабораториях, показали, что в некоторых случаях приобретение клетками мезенхимального фенотипа происходит в течение 12-48 часов. Такое быстрое изменение не может быть объяснено ни возникновением мутаций *de novo*, ни отбором уже существующих мутантных клонов опухолевых клеток [110, 119].

Существенное количество данных накоплено о фенотипических трансформациях GBM в ходе терапии. Например, было показано, что в подавляющем большинстве случаев после лечения фенотип опухоли сдвигается в сторону более мезенхимальных характеристик (**Рис. 32**) [115]. Механизм этого процесса не известен, однако, по крайней мере, в некоторых условиях он основан на прямом и быстром превращении клетки одного фенотипа в клетку другого фенотипа [119].

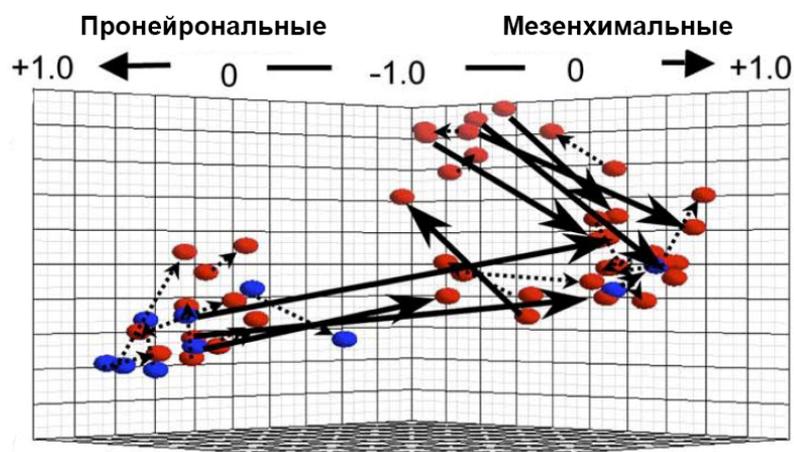


Рисунок 32. Мезенхимальная трансформация глиобластомы после терапии. Анализ экспрессии генов методом принципиальных компонент в парных образцах глиомы, полученных от одних и тех же пациентов до и после лечения. Красным обозначены глиобластомы, синим обозначены глиомы III стадии. Стрелки указывают направление изменений, вызванных терапией [115].

2.3.4. Роль внеклеточных везикул в глиобластомах.

Выше были кратко описаны внутриклеточные факторы, влияющие на фенотип глиобластом, такие как мутации, нарушение процессов метилирования ДНК и изменение уровня экспрессии генов. Однако, не меньшую, а, возможно, и намного большую роль в формировании фенотипа GBM могут играть межклеточные взаимодействия. В случае глиобластом особое внимание уделяется сигналам, передаваемым с помощью межклеточных мембранных пузырьков – везикул (EVs). Везикулы представляют собой уникальный транспортный механизм, позволяющий клеткам обмениваться любыми классами молекул, в том числе белками, липидами, мяРНК, мРНК, участками ДНК, транспозонами, и, наконец, целыми органеллами. Очевидно, что большая часть из перечисленных выше грузов не может быть дистанционно передана между клетками никаким иным способом [120, 121].

В настоящий момент выделяют 4 типа внеклеточных везикул: экзосомы, микровезикулы, онкосомы и апоптотические тельца (**Рис. 33А**). Экзосомы – везикулы наименьшего размера, диаметр которых обычно лежит в диапазоне от 40 до 300 нм [122]. Они формируются в цитоплазме из эндосом (**Рис. 33Б** и **Рис. 34**). При этом происходит выпячивание мембраны эндосомы и отшнуровывание везикулы в люмен эндосомы. Эндосомы, содержащие в себе экзосомы, получили название мультивезикулярные тельца (**Рис. 33Б**). Далее мультивезикулярные тельца сливаются с плазматической мембраной и экзосомы высвобождаются во внеклеточное пространство. Следующими по размеру идут микровезикулы, диаметр которых от 50 до 1000 нм. Этот тип везикул отшнуровывается прямо от поверхности плазматической мембраны. Чуть больше микровезикул – онкосомы, размером от 100 до 2000 нм. Механизм их формирования схож с механизмом образования микровезикул. Наконец, самые большие внеклеточные везикулы это апоптотические тельца, которые представляют собой части погибающих в процессе апоптоза клеток, окружённые плазматической мембраной, их размер от 50 до 5000 нм. Как видно из описания, размеры всех классов везикул сильно перекрываются друг с другом, более того, в настоящий момент не известно ни одного специфического маркера, эксклюзивно присутствующего только на везикулах одного типа. По этой причине чистое выделение лишь одной из фракций везикул считается почти невозможным [120, 121].

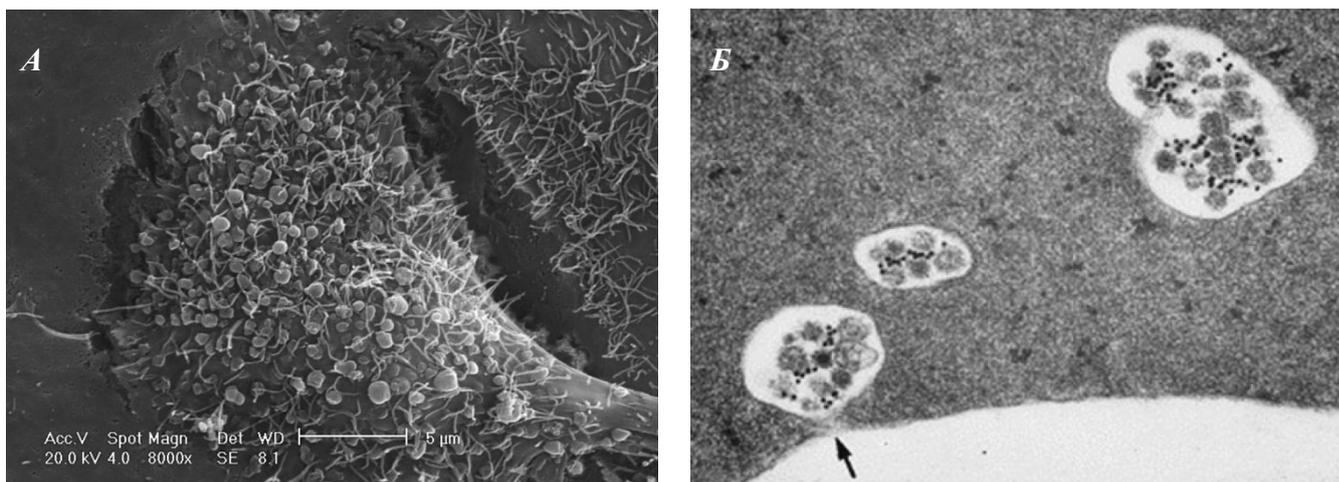


Рисунок 33. А - Электронная микрофотография клетки глиобластомы с отщипывающимися от её поверхности везикулами [121]. Б - Электронная микрофотография мультивезикулярных телец [123].

Очень важно отметить, что за исключением апоптотических телец, все типы везикул переносят специфические грузы. Молекулярные механизмы такого внутриклеточного сортировки до сих пор малопонятно, однако известно, что одним из важных белков, участвующих в загрузке экзосом специфическими молекулами, является белок сплайсосома HNRNPA2B1 [122].

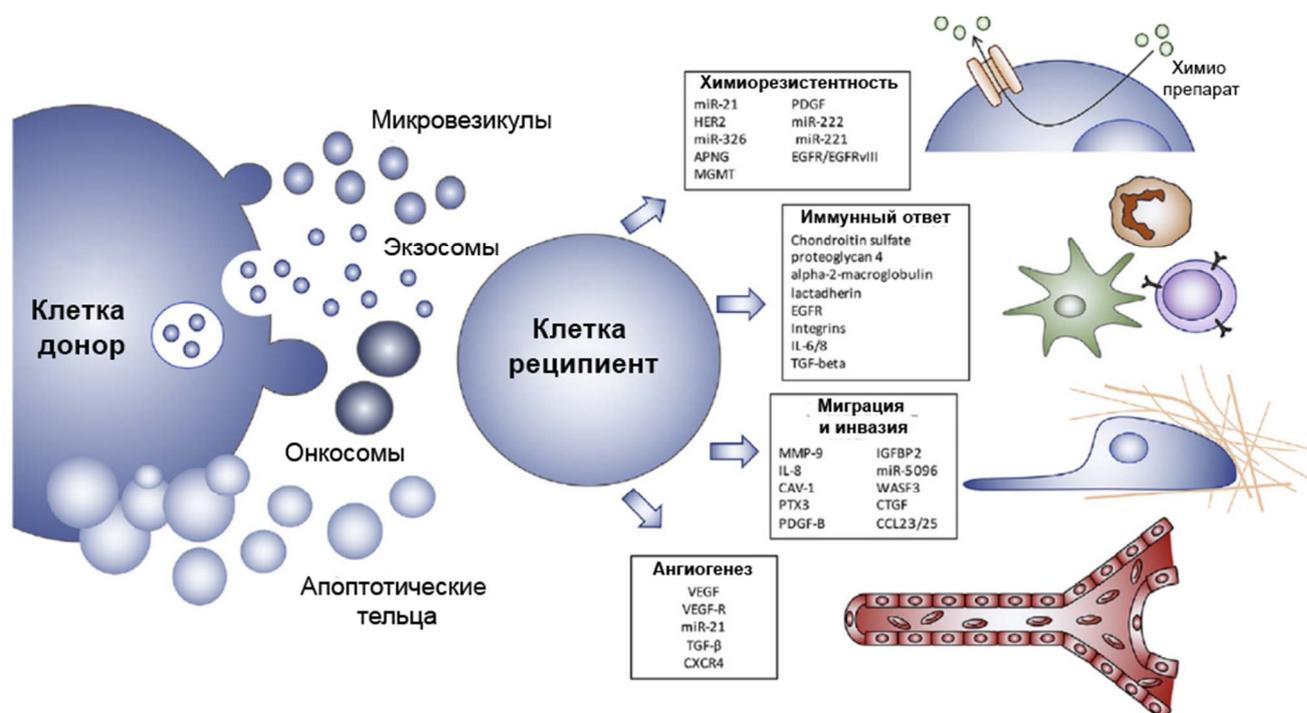


Рисунок 34. Схематическое изображение влияния везикул, секретруемых клетками глиобластомы, на соседние клетки. На рисунке указаны некоторые важные молекулы, переносимые этими везикулами [120].

После того как везикулы были секретированы во внеклеточное пространство, они могут сливаться с мембраной реципиентных клеток и доставлять в их цитоплазму соответствующие грузы. Поскольку набор молекул, переносимых везикулами, может быть самым разным, то и механизм их действия на реципиентные клетки также будет сильно зависеть как от состояния клетки донора везикул, так и от типа клетки акцептора. Однако обобщённо можно сказать, что EVs, секретлируемые глиобластомой выполняют онкогенную роль и способствуют росту опухоли.

Перечисляя основные функции везикул, секретлируемых глиобластомой, следует отметить, что они ускоряют пролиферацию реципиентных опухолевых клеток, способствуют ангиогенезу и репрограммированию сосудистых клеток, расположенных около опухоли, усиливают миграцию и инвазивность глиобластомы, перепрограммируют опухолеассоциированные иммунные клетки, позволяя глиобластоме избегать иммунного ответа, а также повышают устойчивость раковых клеток к разнообразным методам лечения [120, 121]. Однако, несмотря на большое количество уже имеющихся данных, интегральный эффект везикул на фенотип GBM до сих пор не ясен, кроме того не понятно какую роль эти везикулы играют в развитии и эволюции глиобластомы.

3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

3.1. Материалы.

3.1.1. Важнейшее оборудование.

Центрифуги MicroCL 21R (Fisher Scientific) и J2-21 (Beckman); ультрацентрифуга Optima XL-100K (Beckman-Coulter); термостат Термит (ДНК-технология); охладитель проб ОП-01 (Биоком); весы электронные Sartorius research и Sartorius excellence (Sartorius); шейкеры Lab-Line ORBIT Environ Shaker, LabSystems automix и Orbit environ-shaker (LAB-Line instruments); ПЦР-амплификатор Trio-Thermoblock TRIO Heated Lid (Biometra); блоки питания 2301 MACRODRIVER1 (LKB), 2505 TRANSPMOR (LKB) и EPS500 (Pharmacia); спектрофотометры UVIKON 810 (Koniron Instruments) и NanoDrop 2000 (Thermo Fisher); прибор для очистки воды Milli-Q Standart System (Millipore); pH-метр ORION RESEARCH 601A с электродом Corning; автоклав pbi autoclave stematic III; электропоратор E.coli Pulser (BIO-RAD); сканеры для иммунологических 96 луночных планшетов Epsilon Research Limited Plus MKII и Synergy HTX (BioTek Instruments); трансиллюминатор 2011 MACROVUE (LKB); камера для электрофореза в агарозном геле Gel Electrophoresis Apparatus GNA-200 (Pharmacia); прибор для капиллярного электрофореза AB 3730 DNA Analyzer (Thermo Fisher); автоматический CO₂ инкубатор (Heraeus); ламинарный культуральный бокс Logic+ (Labconco); камера для электрофореза в полиакриламидном геле (Pharmacia); камера для блоттинга Mini Blot Module (Thermo Fisher); автоматические пипетки Gilson и Eppendorf; цитометры FACScan (Becton Dickinson) и Attune NxT (Thermo Fisher); клеточный сортер FACSAria III (BD Biosciences); конфокальные микроскопы DM IRE2 (Leica) и Nikon A1 (Nikon); флуоресцентный микроскоп DIAPHOT 300 (Nikon); амплификаторы для ПЦР в режиме реального времени “Mx3005P” (Stratagene) и StepOnePlus (Thermo Fisher); спектрофлуориметры MPF-4000 (Hitachi) и Lambda25 UV/V (PerkinElmer); ультразвуковой соникатор SonoPuls (Bandelin); масс-спектрометры TOF-SIMS 5 (ION-TOF), TripleTOF 5600+ с источником ионов NanoSpray III (ABSciex) и хроматографической системой NanoLC Ultra 2D+ (Eksigent), Ultraflex TOF/TOF (Bruker Daltonik); анализатор трэков наночастиц NanoSight NS500 (NanoSight); анализатор метаболомной активности клеток XF24 Extracellular Flux Analyzer (Seahorse Bioscience); анализатор биолюминисценции *in vivo* IVIS 100 (PerkinElmer); детектор биолюминисценции ImageQuant LAS500 (General Electric); сиквенатор ДНК нового поколения Illumina HiSeq 2000 (Illumina); атомно-силовой микроскоп Integra-Prima (NT MDT); сканирующий электронный микроскоп S-570 (Hitachi) с камерой для напыления золота IB-3 (EIKO); счётчик клеток Countess II (Thermo Fisher).

3.1.2. Расходные материалы.

Пластиковые наконечники и пробирки для ПЦР (Treff Lab); пластиковые микроцентрифужные пробирки на 0.2, 0.5, 1.5 мл и 2.0 мл (Eppendorf); одноразовые пипетки на 2, 5, 10, и 25 (Eppendorf); одноразовые центрифужные пробирки на 15 мл и 50 мл; 96, 24 и 6 луночные планшеты для клеточных культур; 25 см² и 75 см² матрасы для клеточных культур (Corning); Lab-Tek II Chambered Coverglass (Nunc); одноразовые чашки Петри завода медицинских полимеров; медицинская рентгеновская фотоплёнка “ХВМ blue sensitive” (Fotochemische werke GmbH); планшеты для ИФА “EIA/RIA Plate 96 well” (Costar); диализные мешки “Spectra/Pro Membrane MWCO: 3,500” (Spectrum labs); планшеты “Copper Coated High Binding Capacity Plates” (Pierce); картридж “XF 24 FluxPak” (Seahorse Bioscience); концентраты Amicon Ultra-4 30,000 NMWL и Amicon Ultra-15 100,000 NMWL (Millipore).

3.1.3. Основные реактивы и компьютерные программы.

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

Таблица 1. Ключевые материалы, использованные в работе.

НАИМЕНОВАНИЕ	ИСТОЧНИК	ИДЕНТИФИКАТОР
Антитела		
anti-acetylated- α Tubulin	Abcam	Cat# ab179484
anti-active Caspase-3	Abcam	Cat# ab32042
anti-AIF	US Biological	Cat# A1372-33C
anti-ALDH1A3	Abcam	Cat# ab129815
anti-Alix	Abcam	Cat# ab117600
anti-Cav1	Abcam	Cat# ab2910
anti-CD9	Abcam	Cat# ab92726
anti-CD11b	Abcam	Cat# ab133357
anti-CD44	Cell Signaling	Cat# 3570
anti-CD44-APC	Miltenyi Biotec	Cat# 130-098-110
anti-CD63	Abcam	Cat# ab134045
anti-CD133-APC	Miltenyi Biotec	Cat# 130-113-746
anti-CRM1	Novus Biologicals	Cat# NB100-79802
anti-EZH2	ThermoFisher	Cat# MA5-15101
anti-EZH2	Cell Signaling	Cat# 4905
anti-GAPDH	Cell Signaling	Cat# 2118
anti-GFP	Abcam	Cat# ab290
anti-HNRNPA2B1	Abcam	Cat# ab6102
anti-HNRNPC	Abcam	Cat# ab133607
anti-HNRNPU	Abcam	Cat# ab20666
anti-HSP90	US Biological	Cat# 501826
anti-human Nestin	Abcam	Cat# ab22035
anti-human nuclear antigen	EMD Millipore	Cat# MAB4383
anti-Ki67	Cell Signaling	Cat# 9449

anti-LC3B	Cell Signaling	Cat# 3868
anti-Mortalin	Santa Cruz	Cat# sc133137
anti-mouse IgG-Alexa Fluor 488	Cell Signaling	Cat# 4408
anti-mouse IgG-Alexa Fluor 555	Cell Signaling	Cat# 4409
anti-mouse IgG-Alexa Fluor 647	Cell Signaling	Cat# 4410
anti-mouse IgG-Horseradish peroxidase	GE Healthcare	Cat# NXA931
anti-NEK2	Abcam	Cat# ab117553
anti-NEK2	ThermoFisher	Cat# PA5-31259
anti-NEK2	ThermoFisher	Cat# PA5-15337
anti-NEK2	Abcam	Cat# ab55550
anti-NONO	Abcam	Cat# ab70335
anti-Olig2	Abcam	Cat# ab109186
anti-phospho-ATM (S1981)	Abcam	Cat# ab81292
anti-phospho-H2AX	EMD Millipore	Cat# 05-636
anti-PON2	Sigma	Cat# HPA029193
anti-PRPF8	Abcam	Cat# ab185547
anti-rabbit IgG-Alexa Fluor 488	Cell Signaling	Cat# 4412
anti-rabbit IgG-Alexa Fluor 555	Cell Signaling	Cat# 4413
anti-rabbit IgG-Horseradish peroxidase	GE Healthcare	Cat# NA934V
anti-RAN	Santa Cruz	Cat# sc20802
anti-RAN	Novus Biologicals	Cat# NB500-237
anti-RanBP1	Santa Cruz	Cat# sc-28576
anti-RBM11	Abcam	Cat# ab173589
anti-RBM11	Abcam	Cat# ab69358
anti-RBM11	Sigma	Cat# HPA045885
anti-SF3A3	Abcam	Cat# ab156873
anti-SF3B1	Abcam	Cat# ab170854
anti-Smac/DIABLO	Santa Cruz	Cat# sc22766
anti-SNRP70	Abcam	Cat# ab51266
anti-Survivin	Santa Cruz	Cat# sc17779
anti-Tag(C;G;Y)FP	Evrogen	Cat# AB121
anti-TAPA1	Abcam	Cat# ab109201
anti-TGM2	Abcam	Cat# CUB7402
anti-TPX2	Abnova	Cat# PAB11993
anti-TSG101	Abcam	Cat# ab125011
anti-U2AF1	Abcam	Cat# ab172614
anti-U2AF2	Abcam	Cat# ab37530
anti-Vimentin	Abcam	Cat# ab16700
anti-XIAP	US Biological	Cat# 405597
anti- α Tubulin	Abcam	Cat# ab7291
anti- β Actin	Cell Signaling	Cat# 3700
Штаммы бактерий		
E. coli XL1 BLUE Competent Cells	Agilent	Cat# 200249
E. coli BL21(DE3) Codone Plus RIL	Agilent	Cat# 230245
E. coli Stbl3 Competent Cells	ThermoFisher	Cat# C737303
E. coli TOP10 Competent Cells	ThermoFisher	Cat# C404010
Биологические образцы		
Свежие ткани глиобластомы человека после хирургии	The Ohio State University	N/A
Образцы плазмы крови пациентов с различными видами рака	НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина; University of Alabama at Birmingham	N/A
Образцы асцитических жидкостей пациентов с раком яичников	РНЦ Рентгенорадиологии	N/A

Образцы асцитических жидкостей пациентов с циррозом печени	РНЦ Рентгенорадиологии	N/A
Парафиновые срезы глиом человека	University of Alabama at Birmingham	N/A
Замороженные срезы глиом человека	The Ohio State University	N/A
Срезы мозга мышей с трансплантированной человеческой глиобластомой	Получены в этой работе	N/A
Основные химические реактивы		
zVAD(OMe)fmk	Abcam	Cat# ab120487
N-(lissamine rhodamine B sulfonyl)-phosphatidylethanolamine	Avanti Polar Lipids	Cat# 810150P
Blotting Grade Blocker Non Fat Dry Milk	Bio-Rad	Cat# 1706404XTU
iScript reverse transcription supermix (N-(5-Aminopentyl)biotinamide)	Bio-Rad	Cat# 1708841
Serum-free protein block solution	Biotium	Cat# 90079
DakoCytomation target retrieval solution pH 6	Dako	Cat# X090930-2
DakoEnVision+ System–HRP labeled Polymer	Dako	Cat# S236984-2
EnVision+ System–HRP labeled Polymer	Dako	Cat# K400211-2
Isoginkgetin	EMD Millipore	Cat# 416154
Polybrene	EMD Millipore	Cat# TR-1003-G
Satellite Red	Evrogen	Cat# BC001
ДНК полимеразы HS Taq	Evrogen	Cat# PK017B
ДНК полимеразы Encyclo	Evrogen	Cat# PK002B
ДНК полимеразы Tersus	Evrogen	Cat# PK123B
EGF	Peptotech	Cat# AF-100-15
bFGF	Peptotech	Cat# AF-100-18B
XenoLight D-luciferin	PerkinElmer	Cat# 122799
Magne HaloTag Beads	Promega	Cat# G7281
Ni-NTA agarose	Qiagen	Cat# 30230
Tissue-Tek O.C.T. Compound	Sakura Finetek	Cat# 4583
Pladienolide B	Santa Cruz	Cat# sc-391691
XF minimal basal medium	Seahorse Bioscience	Cat# 103335-100
Heparin	Sigma	Cat# H3149
Aldehyde Dehydrogenase	Sigma	Cat# A6338
DMEM - high glucose	Sigma	Cat# D5648
Laminin	Sigma	Cat# 11243217001
Cisplatin	Sigma	Cat# 479306
Темозоломид	Sigma	Cat# T2577
Staurosporin	Sigma	Cat# S4400
Paclitaxel	Sigma	Cat# T7402
5-Aza-2'-deoxycytidine	Sigma	Cat# A3656
Digitonin	Sigma	Cat# 260746
Biotin–cadaverine	Sigma	Cat# A5348
Endothelial cell growth supplement	Sigma	Cat# E2759
Calcium Ionophore A23187	Sigma	Cat# C7522
RIPA buffer	Sigma	Cat# R0278
Phosphatase inhibitor cocktail	Sigma	Cat# P2850
Protease inhibitor cocktail	Sigma	Cat# P8340
Puromycin	Sigma	Cat# P7255
Streptavidin, Alexa Fluor 555 Conjugate	ThermoFisher	Cat# S21381
B27	ThermoFisher	Cat# 12587010
OptiMEM	ThermoFisher	Cat# 11058021
DMEM/F12	ThermoFisher	Cat# 10565-018
StemPro Accutase	ThermoFisher	Cat# A1110501
Trypsin-EDTA	ThermoFisher	Cat# 25200056
StemPro Accutase	ThermoFisher	Cat# A1110501

Fetal bovine serum	ThermoFisher	Cat# 10438018
Penicillin-Streptomycin	ThermoFisher	Cat# 15140122
CO2 Independent Medium	ThermoFisher	Cat# 18045088
LysoTracker Deep Red	ThermoFisher	Cat# L12492
Lipofectamine 2000	ThermoFisher	Cat# 11668019
Lipofectamine LTX	ThermoFisher	Cat# 15338100
Oligofectamine	ThermoFisher	Cat# 12252011
SYBR Select Master Mix	ThermoFisher	Cat# 4472918
AlamarBlue reagent	ThermoFisher	Cat# DAL1100
Alexa Fluor 488 5-TFP Ester	ThermoFisher	Cat# A30005
HisPur Ni-NTA magnetic beads	ThermoFisher	Cat# 88832
Glutathione Agarose	ThermoFisher	Cat# 16100
TMB Substrate Solution	ThermoFisher	Cat# N301
Различные эндонуклеазы рестрикции	ThermoFisher	N/A
T4 DNA ligase	ThermoFisher	Cat# EL0014
T4 DNA Polymerase	ThermoFisher	Cat# EP0061
GeneScan500-LIZ	ThermoFisher	Cat# 4322682
Shrimp Alkaline Phosphatase	ThermoFisher	Cat# 783905000UN
RNase Inhibitor	ThermoFisher	Cat# AM2682
dNTP Mix	ThermoFisher	Cat# R0192
Exosome-Human CD63 Isolation/Detection Reagent (from cell culture media)	ThermoFisher	Cat# 10606D
Vectashield mounting medium containing DAPI	Vector Laboratories	Cat# H-1200
Коммерческие наборы		
Autophagy Detection Kit	Abcam	Cat# ab139484
GOLD Conjugation Kit (20nm, 200D)	Abcam	Cat# ab188215
Quick Start Bradford protein assay	Bio-Rad	Cat# 5000201
Magna RIP Immunoprecipitation Kit	EMD Millipore	Cat# 17-700
ECL Select Western Blotting Detection Reagent	GE	Cat# RPN2235
ECL Prime Western Blotting Detection Reagent	GE	Cat# RPN2232
TruSeq Stranded mRNA-Seq Library Preparation Kit	Illumina	Cat# 20020594
Duolink In Situ Orange Starter Kit	Olink Bioscience	Cat# DUO92102
Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System	Promega	Cat# A9281
PureYield Plasmid Miniprep System	Promega	Cat# A1223
Promega PowerPlex16HS Assay	Promega	Cat# DC2101
HiSpeed Plasmid Midi Kit	Qiagen	Cat# 12643
miRNeasy mini kit	Qiagen	Cat# 217004
RNeasy mini kit	Qiagen	Cat# 74104
DNeasy Blood & Tissue Kit	Qiagen	Cat# 69504
EpiTect Bisulfite Kit	Qiagen	Cat# 59104
ALDEFLUOR Kit	Stemcell Technologies	Cat# 01700
APEX Alexa Fluor 555 antibody labeling kit	ThermoFisher	Cat# A10470
Total Exosome Isolation Kit (from plasma)	ThermoFisher	Cat# 4484450
CellEvent Caspase-3/7 Green Flow Cytometry Assay Kit	ThermoFisher	Cat# C10427
Alexa Fluor 488 Annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit	ThermoFisher	Cat# V13241
Dynabeads Protein G Immunoprecipitation Kit	ThermoFisher	Cat# 10007D
SILAC Protein Quantitation Kit (Trypsin)	ThermoFisher	Cat# A33972
SILAC Protein Quantitation Kit (Lys C)	ThermoFisher	Cat# A33970
DAB peroxidase substrate kit	Vector Laboratories	Cat# SK-4100
Клеточные линии		
Normal Human Astrocytes	Lonza	Cat# CC-2565
A549	ATCC	Cat# CCL-185
HBEC5i	ATCC	Cat# CRL-3245

HepG2	ATCC	Cat# HB-8065
HT1080	ATCC	Cat# CCL-121
MRC5-V2	ATCC	Cat# CCL-171
SKOV3	ATCC	Cat# HTB-77
U87-MG	ATCC	Cat# HTB-14
GBM84	The Ohio State University	Таблица 2
GBM157	The Ohio State University	Таблица 2
GBM1016	The Ohio State University	Таблица 2
GBM83	The Ohio State University	Таблица 2
GBM528	The Ohio State University	Таблица 2
MD30	MD Anderson Cancer Center	Таблица 2
GBM267	MD Anderson Cancer Center	Таблица 2
GBM28	MD Anderson Cancer Center	Таблица 2
GBM711	MD Anderson Cancer Center	Таблица 2
GBM408	University of California, Los Angeles	Таблица 2
GBM374	University of California, Los Angeles	Таблица 2
GBM185A	Получены в этой работе	Таблица 2
GBM1051	Получены в этой работе	Таблица 2
GBM1027	Получены в этой работе	Таблица 2
GBM1079	Получены в этой работе	Таблица 2
GBM1014	Получены в этой работе	Таблица 2
293FT	ThermoFisher	Cat# R70007
Модельные животные		
Мыши NOD scid (<i>Prkdc^{scid}</i>)	The Jackson Laboratory	Cat# 001303
Мыши NU/J (<i>Foxn1^{nu}</i>)	The Jackson Laboratory	Cat# 002019
Мыши BALB/c	Виварий ИБХ РАН	N/A
Олигонуклеотиды		
Праймеры для qRP-PCR	Евроген	N/A
Праймеры для сплайсинг-чувствительной PCR	Евроген	N/A
Праймеры для клонирования	Евроген	N/A
Праймеры для бисульфитного сиквенирования	Евроген	N/A
Праймеры для сиквенирования	Евроген	N/A
Пробы FISH	ДНК-Синтез	N/A
siRNA	Синтол	N/A
Плазмидные векторы		
pHAGE PGK-GFP-IRES-LUC-W	Addgene	Cat# 46793
pMD2.G	Addgene	Cat# 12259
psPAX2	Addgene	Cat# 12260
pEYFP-C	Clontech	Cat# 6005-1
pmKate2-endo	Evrogen	Cat# FP314
pTagRFP-mito	Evrogen	Cat# FP147
pTagCFP-C	Evrogen	Cat# FP111
pTagCFP-N	Evrogen	Cat# FP112
pTagGFP2-C	Evrogen	Cat# FP191
pTagRFP-C	Evrogen	Cat# FP141
pTurboGFP-N	Evrogen	Cat# FP512
pcDNA5/FRT-TG2	National Cancer Center, Goyang, Republic of Korea	N/A
pET28a+	Novagen	Cat# 69864

pFC20K-HaloTag-T7-SP6 Flexi	Promega	Cat# G1691
pGEM-T	Promega	Cat# A3600
pLKO1-1shALDH1A3	Sigma	Cat# 000693
pLKO1-1shNEK2	Sigma	Cat# SH0111
pLKO1-2shALDH1A3	Sigma	Cat# 000693
pLKO1-2shNEK2	Sigma	Cat# SH0111
pLKO1-89shRBM11	Sigma	Cat# 144770
pLKO1-96shRBM11	Sigma	Cat# 144770
pLKO1-shNT	Sigma	Cat# SHC002
pLKO1-shPRPF8	Sigma	Cat# 006445
pCDH-EF1-MCS-IRES-Puro	System Biosciences	Cat# CD532A-2
pEYFP-C-Survivin ¹⁻¹⁰⁹	The Netherlands Cancer Institute	N/A
pEYFP-C-Survivin ⁸⁴⁻¹⁰⁹	The Netherlands Cancer Institute	N/A
pQE80-Survivin	The Netherlands Cancer Institute	N/A
pQE80-Survivin ^{F101A/L102A}	The Netherlands Cancer Institute	N/A
pEBB-AIF-YC	University of Michigan	N/A
pEBB-YN-XIAP	University of Michigan	N/A
pCDH-GFP	Получены в этой работе	N/A
pCDH-GFP-RBM1#1	Получены в этой работе	N/A
pCDH-GFP-RBM1#2	Получены в этой работе	N/A
pCDH-GFP-fsRBM1	Получены в этой работе	N/A
pCDH-mutNEK2	Получены в этой работе	N/A
pCDH-NEK2	Получены в этой работе	N/A
pET28a-Δ63Smac	Получены в этой работе	N/A
pET28a-AIF_FULL	Получены в этой работе	N/A
pET28a-apoAIF	Получены в этой работе	N/A
pET28a-Mort_FULL	Получены в этой работе	N/A
pET28a-Mort_I	Получены в этой работе	N/A
pET28a-Mort_II	Получены в этой работе	N/A
pET28a-mSmac	Получены в этой работе	N/A
pET28a-Ran	Получены в этой работе	N/A
pET-HALO	Получены в этой работе	N/A
pET-HALO-AIF	Получены в этой работе	N/A
pEYFP-CFP	Получены в этой работе	N/A
pEYFP-C-Survivin	Получены в этой работе	N/A
pEYFP-C-Survivin ^{F101A/L102A}	Получены в этой работе	N/A
pEYFP-HNRNPU-CFP	Получены в этой работе	N/A
pEYFP-TG2-CFP	Получены в этой работе	N/A
pGEX-GFP	Получены в этой работе	N/A
pGEX-GFP-Ran	Получены в этой работе	N/A
pGEX-GFP-Survivin	Получены в этой работе	N/A
pGEX-GFP-XIAP ¹²⁵⁻³⁵⁶	Получены в этой работе	N/A
pLCFP-C	Получены в этой работе	N/A
pLCFP-C- Survivin ^{D53A/F101A/L102A}	Получены в этой работе	N/A
pLCFP-C-Survivin	Получены в этой работе	N/A
pLCFP-C-Survivin ^{D53A}	Получены в этой работе	N/A
pLCFP-C-Survivin ^{F101A/L102A}	Получены в этой работе	N/A
pTagCFP-C- Survivin ^{D53A/F101A/L102A}	Получены в этой работе	N/A
pTagCFP-C-Survivin	Получены в этой работе	N/A

pTagCFP-C-Survivin ^{D53A}	Получены в этой работе	N/A
pTagCFP-C-Survivin ^{F101A/L102A}	Получены в этой работе	N/A
pTagCFP-C-XIAP	Получены в этой работе	N/A
pTagCFP-N-Δ63Smac	Получены в этой работе	N/A
pTagCFP-N-mSmac	Получены в этой работе	N/A
pTagGFP2-Coilin	Получены в этой работе	N/A
pTagGFP2-RBM11	Получены в этой работе	N/A
pTagGFP2-NLS	Получены в этой работе	N/A
pTagRFP-C-PON2	Получены в этой работе	N/A
pTagRFP-PRPF3	Получены в этой работе	N/A
pTagYN-Mort	Получены в этой работе	N/A
pTagYN-N	Получены в этой работе	N/A
pTurboGFP-N-PON2	Получены в этой работе	N/A
pTurboGFP-N-PON2 ¹⁻¹⁶⁸	Получены в этой работе	N/A
pTurboGFP-N-PON2 ¹⁻²⁷	Получены в этой работе	N/A
pTurboGFP-N-PON2 ¹⁻⁸³	Получены в этой работе	N/A
pTurboHALO-N-PON2	Получены в этой работе	N/A
Основные компьютерные программы		
GraphPad Prism	GraphPad Software	N/A
FlowJo v10	FLOWJO, LLC	N/A
samtools	http://www.htslib.org	N/A
AS Detector	http://www.novelbio.com/asd/ASD.html	N/A
STRING	https://string-db.org/	N/A
ProteinPilot	SCIEX	N/A
X! Tandem	http://www.thegpm.org/tandem/	N/A
Scaffold 4	Proteome Software	N/A
Lasergene v7	DNASTAR Software Solutions	N/A
Gene Marker Software v1.85	Soft Genetics	N/A
LCS Lite	Leica	N/A
EMBL ImageJ	National Institute of Health	N/A
PixFRET	https://omictools.com/pixfret-tool	N/A
NTA analytical software v2.3	NanoSight	N/A
Flex Analysis 3.3	Bruker Daltonics	N/A
Affymetrix Expression Console software V1.3.1	ThermoFisher	N/A

3.1.4. Буферные растворы.

5x буфер для отжига РНК олигонуклеотидов: 250 мМ Трис-НСl pH 7.6, 500 мМ NaCl в DEPC обработанной воде

Раствор фенола для экстракции ДНК: фенол, содержащий 0.1% 8-гидроксихинолина, 0.2% β-меркаптоэтанола и насыщенный раствором 1М Tris-НСl, pH 8.0

Буфер TBS: 50 мМ Трис-НСl pH 7.6: 150 мМ NaCl

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

Буфер TBST: TBS с 0,1% Твин-20.

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

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

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

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

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

Буфер верхнего геля для электрофореза (БВГ): 0.5 М Трис-НСl pH 6.8, 0.4% SDS

Буфер нижнего геля для электрофореза (БНГ): 1.5 М Трис-НСl pH 8.8, 0.4% SDS

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

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

Буфер С: Буфер В с pH 6.3

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

Буфер D: 50 мМ Трис-НСl pH 7.5, 150 мМ NaCl, 4 мМ DTT, 2 мМ MgCl₂ и коктейль ингибиторов протеаз

Буфер E: pH 8.25: 40 мМ восстановленного глутатиона в буфере D

Буфер F: 50 мМ Трис-НСl pH 7.5, 150 мМ NaCl, 0,5 мМ DTT, 2 мМ MgCl₂

Буфер G: буфер PBS с добавлением 300 мМ имидазола

Буфер H: 20 мМ HEPES pH 7.4, 1 мМ DTT

Буфер I: 1 мМ Tris-НСl, pH 7.2, 70 мМ сахаразы, 210 мМ d-маннитол, 0.1 мМ ЭДТА

Буфер J: 20 мМ Фосфат-Na pH 7.2, 0.02% бычий сывороточный альбумин

Буфер K: 50 мМ HEPES pH 7.9, 100 мМ NaCl, 0.5 мМ DTT, 0.5 мМ EDTA, 0.005% Igepal и коктейль ингибиторов протеаз

Буфер L: 20 мМ Трис-НСl pH 7.5, 150 мМ NaCl, 2 мМ EDTA, 1% TritonX-100, 10% глицерин, коктейль ингибиторов протеаз

Буфер M: 50мМ Трис-НСl pH 7.5, 150мМ NaCl, 1% TritonX100, 0,1% деоксихолат натрия, коктейль ингибиторов протеаз

Буфер O: 10 мМ Трис-НСl pH 7.5, 8 М мочевины, 2 М тиомочевина

Буфер PI: PBS с 50 мкг/мл йодистого пропидия, 0,1 мг/мл РНКазы А и 0,05% TritonX-100

Буфер MT: pH 6,8: 20 mM Трис, 140 mM NaCl, 0,5% NP-40, 1 mM MgCl₂, 2 mM EGTA, 10 μг/мл пактитаксол, коктейль ингибиторов протеаз

Буфер T: 20 mM HEPES pH 7.3, 110 mM KOAc, 2 mM Mg(OAc)₂, 0,5 mM EGTA, 2 mM DTT, 0,005% Дигитонин и коктейль ингибиторов протеаз

2xSSC: 0,03 M цитрат-Na pH 7.0, 0,3 M NaCl

Гибридизационная смесь: 50% деионизованный формамид, 10% декстран сульфат, 5% 20xSSC, 8 нг/мкл флуоресцентно меченный олигонуклеотид

Проявитель: 7 г/л гидрохинон, 40 г/л Na₂SO₃, 50 г/л Na₂CO₃*10 H₂O, 2 г/л KBr, 0,5 г/л Фенидон

Закрепитель для фотоплёнки: 250 г/л Na₂S₂O₃

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

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

3.1.5. Микробиологические среды.

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

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

3.1.6. Среда для культивирования эукариотических клеток.

Среда I: Opti-MEM

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

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

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

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

Среда VI: DMEM/F12, 10% FBS, 2мМ глутамин, пеницилин (100 ед/мл), стрептомицин (100 мкг/мл), 40 мкг/мл смесь факторов роста для эндотелиальных клеток

3.2. Методы.

3.2.1. Методы работы с ДНК.

3.2.1.1. Рестрикция.

Для проведения рестрикции к 250-500 нг. ДНК, добавляли 1 мкл соответствующего концентрированного буфера для эндонуклеаз рестрикции и 0.5 мкл каждого фермента. Объем смеси доводили водой “Milli-Q” до 10 мкл. После внесения всех компонентов в микропробирку смесь перемешивали и инкубировали при 37°C в термостате в течение 2 часов.

3.2.1.2. Дефосфорилирование концов ДНК.

К раствору вектора после рестрикции добавляли 1 мкл фосфотазы SAP и инкубировали при 37°C в термостате в течение 40 минут.

3.2.1.3. Достройка «липких» концов ДНК до «тупых».

К раствору ДНК после рестрикции добавляли смесь дезоксирибонуклеотидтрифосфатов до конечной концентрации 100 мкМ каждого и 0,3 мкл T4 ДНК полимеразы, смесь инкубировалась в течение 10 минут при комнатной температуре.

3.2.1.4. Экстракция ДНК фенолом и хлороформом.

Объем образца ДНК доводили до 100 мкл водой “Milli-Q”, добавляли 50 мкл раствора фенола, смесь перемешивали на вортексе, затем добавляли 50 мкл хлороформа, снова перемешивали и центрифугировали (2 мин, 14000 об/мин). Верхний слой переносили в чистую пробирку и экстрагировали - хлороформом (1:1), после чего центрифугировали (1 мин, 14000 об/мин) и отбирали водную фазу, содержащую ДНК.

3.2.1.5. Осаждение ДНК.

К водному раствору после фенол-хлороформенной экстракции добавляли ацетат натрия (рН 5,2) до конечной концентрации 0,3 М, соосадитель Satellite Red (1 мкл) и трёхкратный объем 96% этанола, хорошо перемешивали и затем помещали на 60 минут на -75°C. ДНК осаждали центрифугированием (10 мин, 14000 об/мин, 4°C), к осадку добавляли 0,7 мл 70% этанола, повторно центрифугировали (5 мин, 14000 об/мин, 4°C), удаляли супернатант и высушивали осадок 2-10 мин. при комнатной температуре. После чего перерастворяли осадок в 10 мкл воды “Milli-Q”.

3.2.1.6. Выделение ДНК из геля.

Полученные после рестрикции фрагменты ДНК разделяли электрофорезом в агарозном геле, содержащем бромистый этидий. Нужный фрагмент ДНК, визуализированный с помощью

трансиллюминатора, быстро вырезали стерильным скальпелем. Очистку ДНК из вырезанного фрагмента геля проводили с использованием фирменного набора “Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System” по инструкции производителя.

3.2.1.7. Электрофорез ДНК.

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

3.2.1.8. Лигирование ДНК.

Смесь для лигирования содержала следующие компоненты: аликвоты растворов вектора и «вставки», 2 мкл 10х буфера для T4 ДНК лигазы и 1 мкл T4 ДНК лигазы. Объем смеси доводили водой “Milli-Q” до 20 мкл. После перемешивания смесь инкубировали при +16⁰С в течение 18 часов.

3.2.1.9. Амплификация фрагментов ДНК методом полимеразной цепной реакции.

Для проведения полимеразной цепной реакции в микропробирках объемом 500 мкл или 200 мкл смешивали по 10 пМ «прямого» и «обратного» праймеров, 2 мкл 10х буфера для ПЦР, 1 мкл 2,5 мМ раствора дезоксирибонуклеотидтрифосфатов, 0.2 мкл ДНК-полимеразы, добавляли ДНК, используемую в качестве матрицы для синтеза, и доводили объем реакционной смеси до 20 мкл водой “Milli-Q”.

При проведении реакции использовали следующий температурный режим:

- 1) 95⁰С – 2'30"
 - 2) 95⁰С – 30" (денатурация)
 - 3) 55-66⁰С – 30" (отжиг праймеров)
 - 4) 72⁰С – 20"-3' (элонгация)
 - 5) 72⁰С – 7'
- } 14-37 циклов

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

Для постановки ПЦР в режиме реального времени использовалась готовая смесь “qPCRMix-HS SYBR” или “SYBR Select Master Mix”, в которую добавляли праймеры, ДНК

матрицу и воду “Milli-Q”. Реакция проводилась в амплификаторе “Mx3005P” или StepOnePlus. Полученные результаты анализировали в программе MxPro или StepOne.

3.2.1.10. Сайт-направленный ПЦР мутагенез.

Для получения ДНК, кодирующей белок с требуемой аминокислотной заменой, проводилось три ПЦР по следующей схеме:

ПЦР Ia: Проводилось 14 циклов ПЦР с праймерами “А” и “В”, в качестве матрицы использовалась плазмидная ДНК в количестве 50 нг.

ПЦР Ib: Проводилось 14 циклов ПЦР с праймерами “С” и “D”, в качестве матрицы использовалась плазмидная ДНК в количестве 50 нг.

Полученные в ходе обоих ПЦР фрагменты ДНК были разделены в 1,5% агарозном геле, целевые продукты были выделены из геля. Выделение проводилось по описанной ранее методике. Смесь продуктов ПЦР Ia и Ib элюировали с колонки 30 мкл воды “Milli-Q”. Полученный таким образом раствор ДНК использовали в качестве матрицы для ПЦР II.

ПЦР II: Проводилось 16 циклов ПЦР с праймерами “А” и “D”, в качестве матрицы было взято 5 мкл смеси фрагментов ДНК [124].

3.2.1.11. Выделение плазмидной ДНК.

Для большинства экспериментов плазмидную ДНК выделяли из бактерий штаммов XL1 BLUE или TOP10 с помощью фирменного набора “PureYield Plasmid Miniprep System” по инструкции производителя.

Для получения лентивирусных частиц плазмидную ДНК выделяли из бактерий штамма Stb13 с помощью фирменного набора “HiSpeed Plasmid Midi Kit” по инструкции производителя.

3.2.1.12. Определение концентрации нуклеиновых кислот.

Для определения концентрации ДНК в кварцевую кювету, содержащую 1 мл воды “Milli-Q”, добавляли 5 мкл исследуемого раствора ДНК и после перемешивания на спектрофотометре измеряли поглощение раствора при λ 260 нм против воды “Milli-Q”. Концентрация ДНК в нг/мл вычислялась умножением полученной оптической плотности на 10. Также концентрация ДНК и РНК определялись с помощью спектрофотометра NanoDrop 2000.

3.2.1.13. Секвенирование плазмидной ДНК.

Секвенирование плазмидной ДНК проводилось по методике Сенгера компанией Евроген.

3.2.1.14. Конструирование плазмидных векторов.

В ходе данной работы было создано более 50 различных плазмидных векторов и синтезировано более 200 олигонуклеотидных праймеров. В связи с этим, на наш взгляд, детальное описание процесса получения каждой плазмиды в отдельности является нецелесообразным, и поэтому здесь мы приводим лишь общую схему создания плазмид. Детали конструирования каждого конкретного вектора могут быть найдены в наших статьях.

Первой стадией создания плазмидных векторов был синтез необходимой ДНК («вставки») с помощью ПЦР. Праймеры для ПЦР подбирались таким образом, чтобы 3' концевая область олигонуклеотида соответствовала амплифицируемой последовательности. В сторону 5' конца от неё создавался сайт узнавания эндонуклеазой рестрикции, после которого, на самом 5' конце праймера, располагались произвольные 4 нуклеотида, выбранные таким образом, чтобы оптимизировать температуру отжига данного олигонуклеотида. Последовательность праймера дополнительно проверялась на наличие шпилек и димер с помощью программы "Lasergene". Для проверки результатов ПЦР проводился электрофорез ДНК. Продукты ПЦР очищали фенолом и осаждали этанолом, после чего полученную ДНК обрабатывали соответствующими эндонуклеазами рестрикции в оптимальном буфере. Параллельно с рестрикцией «вставки» проводилась рестрикция «вектора». На реакцию брали аликвоту раствора вектора, содержащую 0,5 мкг ДНК. После рестрикции проводили дефосфорилирование концов ДНК вектора по методике, описанной выше. Далее, продукты рестрикции «вектора» и «вставки» разделяли в 1,5% агарозном геле, и целевые фрагменты выделяли из геля. Затем, проводили лигирование «вставки» и «вектора» по методике, описанной выше. По завершению реакции ДНК очищали, осаждали этанолом и электропорировали в клетки *E.coli* штамма "XL1 Blue". Трансформированные бактерии втирались на чашки с агаризованной средой, содержащей соответствующий антибиотик, и инкубировались ночь в термостате при температуре 37°C. На следующий день проводился ПЦР скрининг 20 выросших колоний. Из двух клонов, содержащих «вставку», выделяли плазмиды. Эти плазмиды секвенировали для подтверждения того, что, во-первых, рестрикция и лигирование произошли правильным образом, и, во-вторых, что в плаزمидах отсутствуют нуклеотидные замены.

3.2.1.15. Выделение геномной ДНК.

Геномную ДНК выделяли с помощью набора "DNeasy Blood & Tissue Kit" по инструкции производителя.

3.2.1.16. Бисульфитное секвенирование.

Бисульфитная конверсия геномной ДНК проводилась с помощью набора “EpiTect Bisulfite Kit” по инструкции производителя с небольшими модификациями. Использовались следующие условия реакции: 95 °С - 5 мин, 60 °С - 25 мин, 95 °С - 5 мин, 60 °С - 85 мин, 95 °С - 5 мин, 60 °С - 175 мин, 95 °С - 5 мин и затем 60 °С - 120 min. Фрагмент промотера гена RBM11 длиной 719 п.н. (от нуклеотида # -100 до нуклеотида # +619, где сайт инициации транскрипции = +1) был амплифицирован с геномной ДНК, обработанной бисульфитом, с помощью техники “Nested PCR”. Первый раунд ПЦР проводили с праймерами RBM11-biS_for и RBM11-biS_rev при условиях реакции: 95 °С - 5 мин, и затем 28 циклов 95 °С - 30 сек, 65 °С - 30 сек, 72 °С - 60 сек, в заключении смесь инкубировали ещё 7 минут при 72 °С для финальной элонгации. Второй раунд ПЦР проводили с праймерами RBM11-biS_for2 и RBM11-biS_rev при условиях реакции: 95 °С - 5 мин, и затем 22 цикла 95 °С - 30 сек, 67 °С - 30 сек, 72 °С - 60 сек, в заключении смесь инкубировали ещё 7 минут при 72 °С для финальной элонгации. Целевой продукт ПЦР был выделен из геля и клонирован в плазмиду pGEM-T. Лигазная смесь была использована для трансформации бактерий. Затем, для каждого образца геномной ДНК было взято по 12 колоний бактерий, содержащих плазмиду со вставкой. Из этих бактерий выделяли плазмиды и секвенировали полученную ДНК с праймером к T7 промотеру. Последовательности ДНК анализировали с помощью пакета программ “Lasergene”.

3.2.2. Методы работы с РНК.

3.2.2.1. Выделения РНК.

РНК выделялась набором “RNeasy mini kit” из культур клеток человека и набором “miRNeasy mini kit” из образцов внеклеточных везикул по инструкциям производителя.

3.2.2.2. Обратная транскрипция.

Обратная транскрипция проводилась с помощью смеси “iScript reverse transcription supermix” по инструкции производителя.

3.2.2.3. Отжиг РНК олигонуклеотидов.

Все растворы, использованные при работе с РНК олигонуклеотидами, были приготовлены на воде “Milli-Q”, свободной от РНКаз. Для этого в воду “Milli-Q” добавляли DEPC (100 мкл DEPC на литр воды “Milli-Q”) и автоклавировали 40 минут. Полученной водой разводили синтезированные РНК олигонуклеотиды до конечной концентрации 50 μМ, после чего смешивали по 30 мкл растворов комплементарных друг другу олигонуклеотидов (sense и

antisense) и 15 мкл 5x буфера для отжига РНК. Полученный раствор инкубировали 2 минуты при 95°C и затем медленно остужали до комнатной температуры (скорость охлаждения примерно 1 градус в минуту). Таким образом получали 20 μ M раствор миРНК, который далее хранили при -20°C.

3.2.2.4. РНК иммунопреципитация (RIP).

Молекулы РНК, взаимодействующие с белком RBM11, выделялись из клеток GBM157, стабильно экспрессирующих GFP или GFP-RBM11, с помощью антител к GFP и набора “Magna RIP RNA-Binding Protein Immunoprecipitation Kit” по инструкции производителя. Выделенная РНК использовалась для секвенирования последнего поколения.

3.2.2.5. Секвенирование РНК.

Для наибольшей точности анализа изменений в сплайсинге пре-мРНК в данной работе использовалось “100bp paired-end” секвенирование. Библиотеки кДНК для секвенирования с парными концами были приготовлены с помощью набора “TruSeq Stranded mRNA-Seq Library Preparation Kit” по инструкции производителя. Полученные образцы были отсеквенированы на приборе “Illumina HiSeq 2000”.

3.2.3. Методы работы с бактериями.

3.2.3.1. Приготовление электрокомпетентных клеток E.coli.

В колбу объемом 750 мл, содержащую 100 мл среды LB, переносили стерильной микробиологической петлей клетки E.coli и инкубировали ночь при 37°C на шейкере. На следующий день среду с бактериями переливали в колбу объемом 4 литра, содержащую 900 мл свежей среды LB. Ёмкость с клетками инкубировалась на шейкере при комнатной температуре до достижения оптической плотности среды 0,7 при $\lambda = 600$ нм. После этого среду с бактериями центрифугировали (15 мин, 4000 об/мин, 4°C, ротор JS-7,5 Beckman). Супернатант удаляли и осадок ресуспендировали в 10% растворе глицерина в воде “Milli-Q” (заранее охлажденном на льду). Центрифугирование и ресуспендирование осадка повторяли четыре раза, постепенно уменьшая объем глицеринового раствора примерно до 5 мл. После последнего центрифугирования аликвоты клеток по 60 мкл замораживались в жидком азоте и помещались на -70°C для хранения.

3.2.3.2. Трансформация клеток E.coli.

Трансформацию бактерий проводили методом электропорации. Для этого аликвоту компетентных клеток, хранящихся на -70°C, размораживали во льду и добавляли к бактериям 4

мкл раствора ДНК в воде “Milli-Q”. Смесь перемешивали и переносили в щель заранее охлаждённой кюветы для электропорации. Трансформацию проводили на электропораторе при следующих установках: 1800 В, 25мкФ, 200 Ом. После подачи напряжения, к клеткам немедленно добавляли 1 мл среды LB и тщательно перемешивали. Полученную смесь переносили в микропробирку и инкубировали при 37°C в течение 45 минут. После этого проводили посев клеток (50-400 мкл) на агаризованную среду LB с соответствующим антибиотиком и инкубировали в течение 18 часов при 37°C.

3.2.3.3. ПЦР скрининг колоний, выросших на агаризованной среде.

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

3.2.3.4. Индукция синтеза рекомбинантных белков в бактериях *E.coli*.

Клетки из индивидуальных колоний бактерий *E.coli* штамма “BL21(DE3) Codone Plus RIL”, трансформированные плазмидой, кодирующей соответствующий белок, переносили микробиологической петлёй с агаризованной среды в 17 мл среды LB с необходимым антибиотиком и инкубировали ночь на шейкере при 37°C. На следующий день, среду с бактериями переливали в колбу объёмом 750 мл, содержащую 200 мл свежей среды LB с антибиотиком. Ёмкость с клетками инкубировалась на шейкере при 37°C до достижения оптической плотности среды 0,7 при $\lambda = 600$ нм. После этого для индукции транскрипции в среду с бактериями добавляли изопропил- β -D-тиогалактозид до конечной концентрации 1 mM и инкубировали биомассу еще 18 часов на шейкере при комнатной температуре.

3.2.3.5. Консервация штаммов *E.coli*.

Для консервации штаммов *E.coli* бактерии из индивидуальных колоний с агаризованной среды LB переносили микробиологической петлёй в 4 мл жидкой среды LB с антибиотиком и инкубировали ночь на шейкере при 37°C. Утром 850 мкл полученной биомассы переносили в микропробирку, добавляли к ней 150 мкл глицерина и замораживали при температуре -70°C.

3.2.4. Методы работы с белками.

3.2.4.1. Определение концентрации белка по методу Брэдфорда.

Для определения концентрации белка 5-20 мкл исследуемого раствора смешивали с 0,2 мл реагента Брэдфорд и 0,8 мл воды “Milli-Q”. Через 5 минут измеряли оптическую плотность раствора при $\lambda = 595$ нм против контроля (0,2 мл реагента Брэдфорд и 0,8 мл воды “Milli-Q”). Концентрацию белка рассчитывали по калибровочному графику, построенному с помощью БСА.

3.2.4.2. Денатурирующий электрофорез в ПААГ по Лэммли.

Для электрофореза использовали двухслойный вертикальный гель, состоящий из 3% концентрирующего геля сверху и 10-15% разделяющего геля снизу.

Состав разделяющего геля:

- 1) 2,8-4,2 мл 30% акриламида (29:1);
- 2) 2,08 мл БНГ;
- 3) 2,0-3,45 мл воды “Milli-Q”
- 4) 25 мкл 14% ПСА;
- 5) 8,33 мкл ТЕМЕД.

Состав концентрирующего геля:

- 1) 0,35 мл 30% акриламида (29:1);
- 2) 0,75 мл БВГ;
- 3) 1,9 мл воды “Milli-Q”
- 4) 15 мкл 14% ПСА;
- 5) 5 мкл ТЕМЕД.

В камеру для электрофореза сверху и снизу заливали буфер для электрофореза по Лэммли. Образцы белков смешивали с буфером 4xSLB в соотношении 1:3 и прогревали при 95°C в течение 2 минут. Полученный раствор наносили в лунки геля по 10-40 мкл в лунку. Электрофорез проводили при постоянной силе тока 15 мА (на стадии концентрирования) и 30 мА (на стадии разделения).

3.2.4.3. Иммуноблотинг.

При помощи блотера белки переносились с полиакриламидного геля на 0,45 мкм пористую PVDF мембрану. Для этого после электрофоретического разделения белков в камеру для блотинга, заполненную буфером для переноса, помещали между анодом и катодом кассету, в которой последовательно были выложены вымоченные в буфере для переноса два листа фильтровальной бумаги, мембрана, предварительно смоченная в 96% этаноле в течение 5 минут, полиакриламидный гель и снова два листа фильтровальной бумаги. Далее проводили перенос при постоянном напряжении 65 В в течение 1 часа. После переноса мембрану инкубировали в буфере для подавления неспецифической сорбции в течение 1 часа при комнатной температуре и умеренном перемешивании. Далее мембрану инкубировали с раствором первичных антител в буфере TBST в течение ночи на шейкере при температуре +4°C. На следующий день мембрану

промывали 5 раз по 5 минут TBST и помещали в раствор вторичных антител в буфере для подавления неспецифической сорбции. Мембрану инкубировали в течение ещё 1 часа при комнатной температуре на шейкере, после чего снова промыли 5 раз по 5 минут буфером TBST.

3.2.4.4. Проявление мембраны после иммуноблотинга.

На пищевую прозрачную плёнку помещали мембрану и люминесцентную линейку, на мембрану наносили 0,3-1 мл хемиллюминесцентного субстрата “ECL Select” или “ECL Prime” и закрывали сверху вторым слоем пленки. Хемиллюминесценцию фиксировали с помощью фотопленки. После экспозиции фотопленку проявляли, для чего переносили её пинцетом в проявитель на 1 минуту, а затем, промыв дистиллированной водой, в закрепитель ещё на 1 минуту.

3.2.4.5. Выделение белков, содержащих гексагистидиновый участок, в денатурирующих условиях из бактерий E.coli.

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

3.2.4.6. Выделение белков, содержащих глутатион S-трансферазный домен, в не денатурирующих условиях из бактерий E.coli.

После индукции трансляции 200 мл среды с бактериями центрифугировали (15 мин, 4000 об/мин, 4°C, ротор JS-7,5 Beckman), супернатант сливали, осадок ресуспендировали в 10 мл предварительно охлаждённого буфера D. Затем клетки немедленно лизировались ультразвуком. Обработка ультразвуком проводилась во льду на 60% мощности прибора, в течение минуты, после чего раствор перемешивали и ещё на минуту оставляли во льду для охлаждения. Такая процедура повторялась 10 раз. Полученный лизат центрифугировали (15 мин, 15000 об/мин, 4°C, ротор JS-20 Beckman). Супернатант переносили в чистую пробирку, добавили к нему 0,75 мл глутатион-агарозы и инкубировали при постоянном перемешивании 2 часа при 4°C. Полученную

суспензию переносили на колонку. После оседания глутатион-агарозы осадок промывали, пропуская через колонку 20 мл буфера D. Затем на колонку медленно наносили 3 мл элюирующего буфера E и после 15 минут инкубации при комнатной температуре собирали элюат с колонки. Полученный раствор помещали в диализный мешок и диализовали в течение ночи против буфера F.

3.2.4.7. Выделение белков, содержащих Halo-Tag, в не денатурирующих условиях из бактерий E.coli.

После индукции транскрипции 200 мл среды с бактериями центрифугировали (15 мин, 4000 об/мин, 4°C, ротор JS-7,5 Beckman), супернатант сливали, осадок ресуспендировали в 6 мл лизирующего буфера K. Суспензию переносили в охлажденные пробирки и подвергали ультразвуковой обработке в течение 10 мин, перемешивая 1 мин после каждых 2 мин обработки. Полученный лизат центрифугировали (20 мин, 15000 об/мин, 5°C, ротор JS-20 Beckman). К 50 мкл магнитных частиц с иммобилизованным Halo-Tag лигандом добавляли 1,5 мл лизата и инкубировали при постоянном перемешивании при комнатной температуре в течение 1 часа. После этого пробирки со смесью помещали в магнитную подставку, отбирали супернатант и промывали магнитные частицы 1 мл буфера K 4 раза. Далее магнитные частицы с иммобилизованным на них белком использовались для исследования белок-белковых взаимодействий *in vitro*.

3.2.4.8. Исследование взаимодействия рекомбинантных белков in vitro методом «нулл-дауна» с помощью Halo-tag сорбента.

Для получения белкового комплекса аликвоту раствора рекомбинантного белка, имеющего гексагистидиновый участок, инкубировали с 50 мкл магнитных частиц с иммобилизованным на них белком с HALO-последовательностью. Суспензию инкубировали ночь при умеренном перемешивании и температуре +4°C. Магнитные частицы промывали четыре раза PBS и элюировали связавшиеся белки буфером SLB или буфером O.

3.2.4.9. Исследование взаимодействия рекомбинантных белков in vitro методом «нулл-дауна» с помощью Protein-G сорбента.

Для получения белковых комплексов аликвоты растворов двух свежевыделенных рекомбинантных белков, содержащие по 100 мкг исследуемого белка в каждом, смешивали друг с другом. Объем смеси доводили PBS до 1 мл и добавляли 20 мкг антител к одному из белков. Раствор инкубировали ночь при умеренном перемешивании и температуре +4°C. На следующий день к смеси добавляли 50 мкл магнитных частиц с иммобилизованным на них протеином G. Суспензию инкубировали час при комнатной температуре и умеренном перемешивании. Далее

выделение белкового комплекса проводили набором “Dynabeads Protein G Immunoprecipitation Kit” по инструкции производителя.

3.2.4.10. Исследование белок-белковых взаимодействий in vitro методом преципитации белков из клеточных лизатов с помощью Ni-NTA сорбента.

Раствор рекомбинантного белка, имеющего гексагистидиновый участок, инкубировали с 50 мкл магнитных частиц “HisPur Ni-NTA magnetic beads” в течение часа. Далее магнитные частицы промывали одним мл буфера PBS 4 раза. Полученные магнитные частицы с иммобилизованным на них белком использовались для исследования белок-белковых взаимодействий.

Клетки, культивируемые на 75см² матрасе, диссоциировали раствором трипсина-Версена и дважды промывали холодным PBS. Далее клетки лизировали в 2 мл буфера L на льду в течение 30 минут. Лизат центрифугировали 15 минут 15000 об/мин, 4°C и добавляли к магнитным частицам с иммобилизованным на них рекомбинантным белком. Далее суспензию инкубировали при постоянном перемешивании при комнатной температуре в течение 4х часов. После этого пробирки со смесью помещали в магнитную подставку, отбирали супернатант и промывали магнитные частицы один раз 1 мл буфера L и ещё три раза 0,5 мл буфера PBS. Связавшиеся белки элюировали 30 мкл буфером G или буфером O.

3.2.4.11. Исследование белок-белковых взаимодействий in vitro методом преципитации белков из клеточных лизатов с помощью Halo-tag сорбента.

Клетки, культивируемые на 75см² матрасе, трансфецировали плазмидой, кодирующей белок с Halo-tag. Через 48 часов после трансфекции клетки диссоциировали раствором трипсина-Версена и дважды промывали холодным PBS. Далее клетки лизировали в 2 мл буфера M на льду в течение 30 минут. Лизат центрифугировали 15 минут 15000 об/мин, 4°C. После этого Halo-tag белок вместе с взаимодействующими с ним эндогенными белками выделяли с помощью магнитных частиц с иммобилизованным Halo-tag лигандом по инструкции производителя.

3.2.4.12. Коиммунопреципитация.

Для исследования белок-белковых взаимодействий использовался метод коиммунопреципитации. Для этого клетки выращивали на 75 см² матрасе для клеточных культур. При достижении клеточной плотности 70-90% клетки снимали с поверхности пластика раствором трипсина-Версена и переносили в 15 мл пробирку, содержащую 5 мл среды II. Далее клетки центрифугировали 5 минут при 1000 об/мин, ресуспендировали в 5 мл PBS, снова центрифугировали при тех же условиях и ресуспендировали в 2 мл лизирующего буфера L. Через час инкубации на льду лизат интенсивно пипетировали, переносили в микропробирку и

центрифугировали 15 минут при 15 000 g и температуре 4°C. Супернатант, содержащий целевые белки, инкубировали с антителами, иммобилизованными на магнитных частицах, входящих в состав набора “Dynabeads Protein G Immunoprecipitation Kit”. Все дальнейшие действия проводились по инструкции производителя набора.

3.2.4.13. MALDI-TOF масс-спектрометрия.

Белковую смесь разделяли с помощью электрофореза в полиакриламидном геле. Интересующие белковые полосы были вырезаны из полиакриламидного геля и обесцвечены в растворе, содержащем 50% ацетонитрила и 50 мМ бикарбоната аммония, и дегидратированы добавлением 100% ацетонитрила. После удаления ацетонитрила был проведен трипсинолиз в геле в течение 14 ч. при 37°C (буфер для трипсинолиза содержал 13 нг/мкл трипсина и 10 мМ бикарбоната аммония). Остановку реакции проводили двумя объемами раствора, содержащего 0.1% трифторуксусную кислоту. Экстракцию пептидов из геля проводили двумя объемами раствора 50% ацетонитрила в течение 1 ч. Экстрагированные пептиды были сконцентрированы до объема 5 мкл на вакуумной центрифуге. Далее 1 мкл смеси пептидов перемешивали на мишени с раствором матрицы (20 мг/мл 2,5-дигидроксibenзойной кислоты, 50% ацетонитрила и 0,1% трифторуксусной кислоты). Масс-спектры были получены на приборе MALDI Time-of-flight (Ultraflex TOF/TOF, Bruker Daltonik) в отражательном режиме регистрации положительно заряженных ионов в диапазоне масс 500–5000 Да.

3.2.4.14. LC-MS/MS анализ.

К белкам, элюированным с магнитных частиц, добавляли денатурирующий буфер O до финального объема 100 мкл, после чего образцы инкубировались в течение 20 минут при 24 °C. Концентрация белка в каждом образце была измерена с помощью метода Брэдфорда. Далее для восстановления дисульфидных связей белков образцы инкубировали в растворе 5 мМ DTT при 24°C в течение 30 мин и затем проводили алкилирование, инкубируя образцы в растворе 10 мМ йодацетамида при комнатной температуре в течение 20 мин в темноте. Алкилированные образцы были разбавлены раствором 50 мМ бикарбоната аммония в соотношении 1:4; далее к образцам добавляли раствор трипсина (0.01 мкг трипсина на 1 мкг белка), и инкубировали их при 37 °C в течение 12 ч. После проведения гидролиза реакцию останавливали добавлением муравьиной кислоты до финальной концентрации 5%. Далее полученные триптические пептиды были обессолены с использованием микроколонок Discovery DSC-18 (1-мл пробирки, с допустимой нагрузкой 50 мг) (Sigma-Aldrich), высушены в вакуумном испарителе, и хранились при 80°C до их LC-MS/MS анализа. Анализ проводили на масс-спектрометре TripleTOF 5600+, оснащенном источником ионов NanoSpray III (ABSciex) и совмещенном с нано-поточной хроматографической системой NanoLC Ultra 2D+ (Eksigent). Буфер для нанесения образца и

буфер 1 содержал: 98.9% воды, 1% метанола, 0.1% муравьиной кислоты (об./об.). Буфер 2 представлял собой смесь 99.9% ацетонитрила и 0.1% муравьиной кислоты (об./об.). Разделение пептидов осуществляли на колонке 3C18-CL-120 (3 μm 120 \AA 75 μm *150 мм; Eksigent) при скорости потока 300 нл/мин в линейном повышающемся градиенте буфера 2 (от 5% до 40% в течение 90 мин). Для идентификации пептидов использовался данные-зависимый режим работы масс-спектрометра (IDA). Каждый цикл включал 1 обзорный MS1 спектр с последующими 50 зависимыми MS2 спектрами. Для MS1 анализа использовались следующие параметры работы прибора: диапазон масс для анализа и последующего отбора ионов для фрагментационного анализа 300-1250 m/z, время накопления сигнала 250 мсек. Ионы для MS2 анализа выбирались на основании интенсивности ионного тока с пороговым значением 200 импульсов в секунду и зарядом от +2 до +5. Для MS2 анализа использовались следующие параметры: разрешение квадруполя UNIT (0.7 Да), диапазон масс 200-1800 m/z, оптимизация фокусировки ионного пучка – для получения максимальной чувствительности (разрешение \sim 20000), время накопления сигнала 50 мсек для каждого иона. Раствор триптического гидролизата β -галактозидазы (20 фемтомоль) был использован с 15-мин градиентом (5% до 25% буфера В) для калибровки масс-спектрометра и контроля производительности, стабильности и воспроизводимости системы.

3.2.4.15. Исследование белок-белковых взаимодействий на твёрдой фазе с помощью планшетов “Copper Coated High Binding Capacity Plates”.

Для исследования влияния различных соединений на белок-белковые взаимодействия *in vitro* применялись планшеты с лунками, покрытыми ионами меди “Copper Coated High Binding Capacity Plates”. Перед использованием лунки планшета промывали 3 раза буфером TBST. Затем в них добавляли по 100 мкл раствора белка, имеющего гексагистидиновый участок. Планшет инкубировали 1 час на шейкере при комнатной температуре и промывали 3 раза буфером PBS. Далее в лунки добавляли по 100 мкл раствора белка с GST доменом, а также различные концентрации исследуемых низкомолекулярных соединений. После этого планшет инкубировали ещё 4 часа на шейкере при комнатной температуре, промывали 4 раза PBS и добавляли в лунки по 100 мкл элюирующего буфера G. Через 10 минут инкубации при комнатной температуре раствор из лунок отбирали и использовали для дальнейшего анализа.

3.2.4.16. Иммуоферментный анализ.

Образцы, разведенные в буфере PBS:метанол (9:1), наносили на 96-луночный планшет для ИФА по 100 мкл в лунку. Планшет инкубировали час при комнатной температуре на шейкере, затем жидкость из лунок выливали и добавляли в каждую лунку по 200 мкл буфера TBST с добавлением 1% BSA и инкубировали ещё час при комнатной температуре на шейкере. Потом лунки промывали 5 раз буфером TBST и добавляли в каждую лунку раствор первичных антител

в TBST. Планшет инкубировали 1 час при комнатной температуре на шейкере, затем снова промывали 5 раз буфером TBST и добавляли по 100 мкл раствора разбавленных в TBST вторичных антител, конъюгированных с пероксидазой хрена. Далее планшет инкубировали ещё 1 час при комнатной температуре на шейкере, после чего промывали 6 раз TBST. Визуализацию проводили с помощью субстратной смеси, содержащей 3,3',5,5'-Тетраметилбензидин (ТМБ). Для этого в лунки добавляли 100 мкл свежеприготовленного субстрата для ИФА, инкубировали 15 минут при 37°C, и затем останавливали ферментативную реакцию добавлением 50 мкл 1 М H₂SO₄ в каждую лунку. После этого проводили измерение оптической плотности раствора при $\lambda = 450$ нм.

3.2.4.17. Конъюгация антител с золотыми наночастицами.

Антитела были очищены от примесей с помощью “Dynabeads Protein G Immunoprecipitation Kit” по инструкции производителя. Связавшиеся с магнитными частицами антитела элюировали добавляя 30 мкл 0,1М Фосфатом натрия pH 2.3. К элюату добавляли 3 мкл 1М NaOH, после чего антитела конъюгировали с золотыми нано частицами с помощью набора “GOLD Conjugation Kit” по инструкции производителя.

3.2.5. Методы оценки эффективности низкомолекулярных ингибиторов in vitro.

3.2.5.1. Спектрофлуориметрическое титрование.

Константа диссоциации комплекса белка Survivin с его низкомолекулярным ингибитором “LLP-3” определялась с помощью спектрофлуориметрического титрования раствора LLP-3 рекомбинантным Survivin. Для этого в кварцевую кювету, содержащую 1 мкМ раствора LLP-3 в буфере Н, добавляли раствор рекомбинантного белка Survivin в том же буфере. Через 2-3 минуты после добавления каждой порции белка Survivin спектр флуоресценции раствора измеряли на спектрофлуориметре MPF-4000 в диапазоне λ от 500 до 650 нм и длине волны возбуждения 390 нм. Полученные спектры корректировались на величины выгорания и разбавления LLP-3, происходившие в процессе эксперимента.

3.2.5.2. Определение эффективности ингибирования альдегид дегидрогеназной активности.

Эффективность ингибитора альдегид дегидрогеназы оценивали по способности соединений “GA11” и “GA23” ингибировать активность дрожжевого фермента ALDH. Ферментативная активность определялась с помощью измерения поглощения при λ 340 нм на спектрофотометре PerkinElmerCMP#a Lambda25 UV/V. В каждом эксперименте готовили 1 мл реакционной смеси, состоящей из 1 М Трис-НСl pH 8.0, 3 М КCl, 0.5 мМ Ацетальдегид, 0.33 М β -меркаптоэтанол, 20 мМ NAD⁺ и 0.1 ед. фермента ALDH. К реакционной смеси быстро

добавляли 10 мкл раствора ингибитора в DMSO или только DMSO в качестве контроля. Далее измеряли поглощение при 37°C в течение 4х минут. Все ингибиторы добавлялись в финальной концентрации 100 мкМ, 10 мкМ и 1 мкМ. Все измерения проводились в трёх технических и двух биологических повторах. Полученные кривые корректировались на величины не ферментативной конверсии NAD^+ , происходившие в процессе эксперимента.

3.2.5.3. Анализ ингибирования киназной активности KINOMEscan.

Способность соединения “СМР3а” ингибировать активность различных киназ была оценена с помощью сервиса “KINOMEscan” от DiscoverX Corporation. Для того чтобы определить константу диссоциации СМР3а от киназы NEK2, была использована панель “KdELECT” (<https://www.discoverx.com/services/drug-discovery-development-services/kinase-profiling/kinomescan/kdelect>). Для того чтобы оценить способность СМР3а ингибировать активность 97ми различных киназ была использована панель “scanEDGE” и разведение СМР3а 15 нМ в DMSO (<https://www.discoverx.com/services/drug-discovery-development-services/kinase-profiling/kinomescan/scanedge>).

3.2.6. Методы работы с эукариотическими клетками.

3.2.6.1. Культивирование клеток.

Все клетки выращивали при температуре 37°C в атмосфере 5% CO_2 при 100% влажности. Клетки глиобластомы культивировали на среде IV в виде нейросфер и при необходимости диссоциировали Аккутазой. Для прикрепления клеток к стеклу или пластику поверхность предварительно инкубировали в течение ночи при комнатной температуре с раствором ламинина в PBS (1:200). Нормальные человеческие астроциты (ННА) выращивали на среде V и при необходимости диссоциировали раствором Трипсина-Версена. Клетки эндотелия мозга человека выращивали на среде VI и при необходимости диссоциировали Аккутазой. Все остальные клетки выращивали на среде II и при необходимости диссоциировали раствором Трипсина-Версена.

3.2.6.2. Создание первичных клеточных линий глиобластомы.

Нами была разработана собственная оригинальная методика, позволяющая успешно получать первичные культуры клеток глиобластомы из опухолей пациентов с эффективностью более 80%. Через 1-5 часов после хирургического удаления участок опухолевой ткани массой более 0.4 г. был последовательно промыт в трёх чашках Петри с 20 мл буфера PBS в каждой. Опухоль промывалась таким образом, чтобы максимально избавиться от эритроцитов, находящихся в кровеносных сосудах. Далее опухоль помещали в чашку Петри содержащую 5 мл буфера PBS и 5 мл раствора Трипсина-Версена. С помощью пинцета и скальпеля ткань нарезали

на фрагменты 1-2 мм в диаметре, после чего чашку Петри с опухолью инкубировали 10 мин при 37°C. Далее раствор из чашки петри вместе с фрагментами опухоли переносили в 15 мл пробирку и пипетировали 15-30 раз пипеткой на 10 мл. После этого пробирку инкубировали ещё 10 минут при 37°C и суспензию снова пипетировали 15-30 раз пипеткой на 10 мл. Далее, пробирку икубировали 10 минут при 37°C, после чего ещё раз пипетировали 15-30 раз пипеткой на 10 мл. Полученную суспензию продавливали через сито с порами 40 мкм, надетое на 50 мл пробирку. Далее объём смеси доводили до 35 мл буфером PBS и после тщательного перемешивания центрифугировали 10 мин при 500g. Супернатант декантировали, а осадок ресуспендировали в 35 мл свежего PBS. Полученную суспензию без давления пропускали через сито с порами 40 мкм и центрифугировали 10 мин при 300g. Далее супернатант декантировали, а осадок ресуспендировали в 35 мл свежего PBS и повторно центрифугировали 10 мин при 300g. После этого супернатант декантировали, осадок ресуспендировали в 20 мл среды DMEM/F12, которую затем без давления пропускали через сито с порами 40 мкм и центрифугировали 10 мин при 300g. После этого осадок клеток ресуспендировали в 10 мл среды IV и выдерживали в CO₂ инкубаторе в течение суток в 25 см² матрасе (1). На следующий день неприкрепившиеся клетки со средой переносили во второй матрас (2), покрытый ламинином, а в (1) матрас добавляли 10 мл свежей среды IV. Оба матраса выдерживали в CO₂ инкубаторе в течение суток и на следующий день в матрасе (2) меняли среду на свежую, декантируя все неприкрепившиеся клетки. Далее клетки на обоих матрасах культивировали пока плотность клеток не станет более 50% и после этого клетки диссоциировали, добавляя в матрасы по 2 мл Аккутазы. Затем клетки из обоих матрасов объединяли и растили вместе на 25 см² матрасе на среде IV в виде нейросфер. Периодически клетки переносили в новый матрас, отбрасывая те клетки, которые не откреплялись от пластика после интенсивного пипетирования. Все созданные клеточные линии подвергались STR анализу с целью подтвердить и контролировать в дальнейшем их идентичность.

3.2.6.3. STR анализ первичных клеточных линий.

Геномная ДНК была выделена из клеток и использована для STR анализа с помощью набора “Promega PowerPlex16HS Assay” по инструкции производителя. Вероятность случайного совпадения фереограмм двух клеточных линий, определённых с помощью данного набора, оценивается как 1 к 1.83×10^{17} . Полученные продукты ПЦР были разделены с помощью капиллярного электрофореза на приборе AB 3730 DNA Analyzer. Для точного определения молекулярной массы фрагментов ДНК использовался внутренний стандарт GeneScan500-LIZ. Значения аллелей присваивались с помощью программы Gene Marker Software Version 1.85. STR профиль всех линий глиобластомы, использованных в данной работе приведён в **Таблице 2**.

Таблица 2. Результаты STR анализа клеточных линий, полученных в данной работе.

Клеточная линия	84	157	MD30	1016	528	185A	267	28	408	1051	1027	711	1079	1014	374	
Лocus и его ферограмма	D3S1358	16	16	16	15	15	15	15	16	17	16	16	14	16	15	15
		19	16	16	16	15	18	16	17	17	17	16	16	18	17	16
	TH01	6	6	9	9,3	7	6	8	6	7	8	7	6	6	6	7
		6	7	9	9,3	7	6	9,3	6	9,3	9,3	9,3	9,3	9,3	7	8
	D21S11	29	29	29	28	29	27	29	29	26	31,2	32,2	28	29	29	29
		31,2	31	30	31,2	31,2	27	32,2	30	29	31,2	32,2	30	30	30	31,2
	D18S51	13	16	19	15	13	12	15	15	12	16	12	13	14	13	14
		16	17	19	17	13	12	18	15	13	17	14	18	18	19	16
	Penta_E	12	10	14	11	10	10	5	11	7	11	8	11	12	5	16
		14	20	14	12	12	11	7	14	16	12	12	18	16	11	21
	D5S818	11	11	12	12	11	13	11	11	10	9	11	11	12	11	10
		11	13	13	13	13	14	12	12	12	11	12	13	12	12	13
	D13S317	8	10	12	12	8	11	8	10	12	8	12	11	8	8	10
		10	13	12	12	13	12	13	12	12	10	12	11	9	12	13
	D7S820	8	12	10	9	9	8	7	9	10	10	8	8	8	10	8
		8	12	10	10	11	10	8	10	10	11	10	11	14	12	12
	D16S539	12	9	9	9	11	11	12	12	10	11	11	10	11	10	9
		13	11	9	11	12	13	12	12	10	12	11	11	11	12	11
	CSF1PO	12	10	12	9	10	13	12	9	7	10	10	10	10	10	11
		12	12	12	10	12	13	13	10	11	12	12	11	12	11	11
	Penta_D	9	11	9	9	9	11	10	10	12	9	10	11	11	11	11
		12	13	9	12	10	13	14	14	12	9	10	13	12	12	11
	AMEL	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
		X	X	X	Y	X	Y	X	X	Y	Y	Y	X	X	Y	X
	vWA	14	14	15	15	14	17	15	16	16	17	14	15	17	17	17
		18	19	15	19	19	18+19	16	18	18	19	15	15	18	19	17
	D8S1179	11	10	10	11	13	10	13	12	12	13	14	12	9	11	14
		13	15	12	13	13	15	15	13	15	14	14	13	13	11	15
	TPOX	8	9	9	8	8	8	8	11	8	8	11	8	8	8	8
		9	11	9	11	8	11	9	11	11	9	11	8	11	9	8
	FGA	22	20	25	22	20	19	21	25	21	22	21	20	22	23	24
		26	22	25	22	22	19	26	25	25	22	23	21	23	24	25

3.2.6.4. Трансфекция клеток плазмидной ДНК.

За день до трансфекции клетки пересаживали на новый культуральный пластик. В случае глиобластомы пластик предварительно покрывали ламинином. Количество клеток выбиралось таким образом, чтобы в день трансфекции плотность клеток составила 60-80%. Перед трансфекцией готовили две смеси, объём которых рассчитывался исходя из площади флакона, в котором производилась трансфекция. Так на 1 см² готовили по 50 мкл каждой из двух смесей. Ниже приведено количество реагентов, необходимых для трансфекции клеток, растущих на

площади 1 см². В первую пробирку добавляли 0,5 мкг плазмидной ДНК, 0,5 мкл Plus Reagent и 50 мкл среды I, а во вторую пробирку 2 мкл липофектамина LTX и 50 мкл среды I. Растворы инкубировали в течение 5 минут при комнатной температуре, после чего перемешивали друг с другом и выдерживали ещё 30 минут при комнатной температуре. После этого среду из лунок с клетками отбирали и добавляли в лунки 100 мкл полученной трансфекционной смеси и 100 мкл свежей среды для выращивания соответствующего типа клеток. Далее клетки оставляли на 24 часа в СО₂ инкубаторе, после чего среду в лунках меняли на свежую. Ещё через 24 часа трансфецированные клетки использовались для необходимых экспериментов.

3.2.6.5. Трансфекция клеток миРНК.

За день до трансфекции клетки пересаживали в лунки 6-луночного планшета для клеточных культур в количестве $2 \cdot 10^5$ клеток на лунку. В день трансфекции готовили две смеси: в одну пробирку добавляли 300 пМ миРНК и 250 мкл среды I, а во вторую 15 мкл олигофектамина и 60 мкл среды I. Растворы инкубировали в течение 5 минут при комнатной температуре, после чего перемешивали друг с другом и выдерживали ещё 20 минут при комнатной температуре. После этого среду из лунок с клетками отбирали и добавляли в лунки 325 мкл полученной трансфекционной смеси и 1 мл свежей среды. Далее клетки оставляли на 24 часа в СО₂ инкубаторе, после чего среду в лунках меняли на свежую.

3.2.6.6. Получение лентивирусных частиц.

За двое суток до трансфекции клетки линии 293FT были посажены в 25 см² матрас в таком количестве, чтобы в день трансфекции плотность клеток составила 40-60%. Перед трансфекцией готовили две смеси: в одну пробирку добавляли по 1, 3, и 4 мкг плазмид pMD2.G, psPAX2 и основной лентивирусной плазмиды (серии pLCP, pLKO или pCDH) соответственно, 8 мкл Plus Reagent и 750 мкл среды I. Во вторую пробирку добавляли 20 мкл липофектамина LTX и 750 мкл среды I. Растворы инкубировали в течение 5 минут при комнатной температуре, после чего перемешивали друг с другом и выдерживали ещё 30 минут при комнатной температуре. После этого среду из матраса с клетками аккуратно отбирали и медленно добавляли в лунки 1.5 мл полученной трансфекционной смеси и 2 мл свежей среды II. Далее клетки оставляли на 24 часа в СО₂ инкубаторе, после чего среду аккуратно заменяли на среду III. На 4й день после трансфекции среду с вирусными частицами отбирали и пропускали без давления через фильтр с порами 0.45 мкм. Из среды, содержащей вирусные частицы, делали аликвоты по 1 мл, замораживали их в жидком азоте и хранили при температуре -80°C. Важным признаком успешной продукции вирусных частиц служило образование синцитиев клетками 293FT на 3й - 4й день после трансфекции (**Рис. 35**).

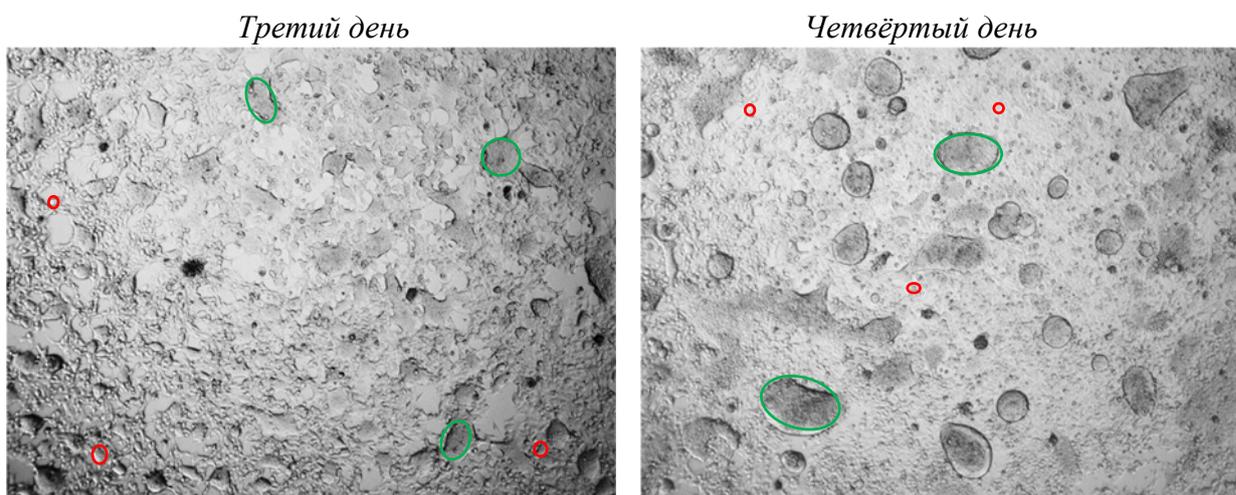


Рисунок 35. Синцитии, образованные клетками линии 293FT при продукции лентивирусных частиц на третий и четвёртый день после трансфекции. Границы некоторых единичных клеток и синцитиев обозначены красным и зелёным соответственно.

3.2.6.7. Трансдукция клеток лентивирусными частицами.

Клетки диссоциировали и помещали в лунки 6-луночного планшета по $4 \cdot 10^5$ клеток на лунку. В случае глиобластомы пластик предварительно покрывали ламинином. Объём среды с клетками в лунках доводили до 1 мл соответствующей средой, после чего добавляли ещё 1 мл полученной ранее среды с вирусными частицами и полибрен до финальной концентрации 8 мкг/мл. Клетки инкубировались с вирусными частицами в течение 24 часов, после чего среду в лунках заменяли на свежую.

3.2.6.8. Селекция клеток, инфицированных лентивирусными частицами.

Через 48 часов после трансдукции, среду клеток заменяли на селективную среду, содержащую 1-2 мкг/мл Пурамицина. На следующий день среду заменяли на свежую, также содержащую 1-2 мкг/мл Пурамицина. Ещё через двое суток среду заменяли на свежую, не содержащую Пурамицина.

3.2.6.9. Индукция апоптоза.

Для индукции апоптоза использовались противоопухолевые препараты такие как Таксол, Цисплатин (CP), Темозоломид (TMZ), Стауроспорин (STS) и различные дозы γ -излучения (IR). Эти соединения добавлялись в разной концентрации и в разные моменты времени. Необходимо отметить, что индукторы апоптоза никогда не добавлялись в тот же день, когда производилась диссоциация клеток. В некоторых экспериментах вместе с индуктором апоптоза добавлялся ингибитор каспаз zVAD(OMe)fmk.

3.2.6.10. Определение IC₅₀ различных противоопухолевых препаратов.

Для оценки жизнеспособности клетки помещали в лунки 96-луночного планшета (по 6000 на лунку) и на следующий день добавляли различные концентрации противоопухолевых препаратов. Через 4-6 дней жизнеспособность клеток определялась с помощью Аламарового голубого по инструкции производителя. Эксперимент проводился для 8-10 различных концентраций препарата. Влияние каждой концентрации на жизнеспособность клеток измерялось в 6ти биологических повторах.

3.2.6.11. Исследование белок-белковых взаимодействий методом BiFC.

BiFC позволяет получить информацию о локализации и интенсивности взаимодействия исследуемых белков в живой клетке. Данный метод основан на интересном свойстве жёлтого флуоресцентного белка, способного флуоресцировать, даже будучи разделённым на две отдельные части. В случае если обе половины разделённого YFP окажутся на достаточно близком расстоянии друг от друга, может произойти их объединение в нормально флуоресцирующую форму YFP. Для исследования белок-белковых взаимодействий методом BiFC клетки были трансфицированы двумя плазмидами, кодирующими пару исследуемых белков, связанных с C- и N-концевыми фрагментами YFP соответственно. Через 24 часа после трансфекции с помощью конфокального микроскопа было получено изображение клеток, экспрессирующих исследуемые белки. Для каждого образца анализировалось не менее 50 трансфицированных клеток.

3.2.6.12. PLA анализ.

Принцип PLA анализа заключается в том, что фиксированные и пермеабелизированные клетки инкубируются с антителами к исследуемым белкам, а антитела ковалентно связаны с олигонуклеотидами особой последовательности и длины. Если олигонуклеотиды, соединённые с разными антителами, оказались достаточно близко друг от друга (такое возможно только в случае взаимодействия исследуемых белков) то при добавлении ДНК-полимеразы на этих нуклеотидах начинается амплификация ДНК по принципу «разматывающегося кольца» (так достигается более чем тысячекратное усиление сигнала). После этого клетка инкубируется с флуоресцентно меченным олигонуклеотидным зондом, который отжигается в тех местах, где амплифицировалась соответствующая ДНК. В результате внутриклеточные белок-белковые взаимодействия визуализируются в виде точечных флуоресцирующих областей, количество которых пропорционально интенсивности связывания исследуемых белков. Таким образом, PLA анализ позволяет количественно оценить уровень взаимодействия исследуемого белка с любыми другими белками, а также определить компартмент клетки и стадию клеточного цикла, в которой это взаимодействие имеет место [125].

Для PLA анализа клетки, находящиеся в лунках камеры “Lab-Tek II”, трижды промывали PBS, и обрабатывали буфером для фиксации в течение 15 минут при комнатной температуре. Все дальнейшие действия проводились с помощью набора “Duolink In Situ Orange Starter Kit” по инструкции производителя.

3.2.6.13. Регистрация FRET и фотообесцвечивание акцептора.

Клетки котрансфецировали плазмидами серии pTagCFP и pEYFP, взятыми в соотношении 2:1, соответственно. Через 48 часов после трансфекции клетки сканировали на конфокальном микроскопе с объективом PL APO HCX 63 x 1,40 с масляной иммерсией и дополнительным 8-кратным цифровым увеличением. Клетки, флуоресцирующие при возбуждении лазерами $\lambda = 458$ нм и $\lambda = 514$ нм (т.е. коэкспрессирующие CFP и YFP), выбирались для регистрации FRET и фотообесцвечивания акцептора. Флуоресценцию CFP возбуждали при длине волны 458 нм и регистрировали на ФЭУ-1 при напряжении питания 735В в диапазоне длин волн от 465 до 505 нм. FRET регистрировали при возбуждении лазером с $\lambda = 458$ нм на ФЭУ-2 при напряжении питания 935В в диапазоне длин волн от 525 до 600 нм. Флуоресценцию YFP возбуждали при длине волны 514 нм и регистрировали на ФЭУ-2 при напряжении питания 935В в диапазоне длин волн от 525 до 600 нм. После регистрации флуоресценции CFP, YFP и FRET в клетках проводили фотообесцвечивание акцептора. Для этого клетки многократно сканировали лазером максимальной мощности с $\lambda = 514$ нм со скоростью сканирования 37 кадров в минуту в течение 310 секунд. После фотообесцвечивания флуоресценция CFP, YFP и FRET регистрировали повторно. Далее фотообесцвечивание акцептора повторяли и снова регистрировали флуоресценцию CFP, YFP и FRET. Анализ полученных изображений производили с помощью программ “LCS Lite” и “PixFRET”. Значение N_{FRET} рассчитывали по формуле $FRET/\sqrt{(I_{Donor} * I_{Acceptor})}$.

3.2.6.14. Иммуоцитофлуоресцентная микроскопия.

Для иммуоцитофлуоресцентной микроскопии клетки, находящиеся в лунках камеры “Lab-Tek II”, трижды промывали PBS (здесь и далее объём буфера составлял 250 мкл на лунку; все операции проводились при комнатной температуре), и обрабатывали буфером для фиксации в течение 15 минут. В некоторых случаях перед фиксацией клетки инкубировали 4 минуты в буфере T. После фиксации клетки два раза промывали PBS и инкубировали с пермеабилзирующим буфером ещё 15 минут. Далее в лунки на 30 минут добавляли “Serum-free protein block solution” и после этого клетки инкубировали с раствором первичных антител в TBST в течение часа. Затем клетки промывали 5 раз TBST и инкубировали ещё 1 час с раствором вторичных антител, конъюгированных с флуоресцентными красителями, в буфере TBST. Для отмывки несвязавшихся антител клетки промывали TBST ещё 6 раз и после этого, отобрав из

лунок весь буфер, добавляли к клеткам раствор DAPI. Через 10 минут клетки анализировали под флуоресцентным микроскопом. Наиболее характерные для исследуемой популяции клетки фотографировали.

3.2.6.15. Флуоресцентная гибридизация in situ (FISH).

Для исследования внутриклеточной локализации РНК использовался метод FISH. Для этого клетки, находящиеся в лунках камеры “Lab-Тек II”, дважды промывали PBS и обрабатывали буфером для фиксации в течение 30 минут при комнатной температуре. Затем лунки ещё два раза промывали PBS и инкубировали с пермеабилзирующим буфером 10 минут при 4°C. Далее клетки один раз промывали PBS и два раза 2xSSC, после чего инкубировали с гибридизационной смесью ночь при 42°C. На следующий день лунки многократно промывали различными буферными растворами: 50% формамидом в 2xSSC (3 раза по 10 минут при 42 °C), 2xSSC (10 минут при 42°C), 2xSSC (10 минут при комнатной температуре), 4xSSC (10 минут при комнатной температуре) и PBS (3 раза по 10 минут при комнатной температуре). После этого, отобрав из лунок весь буфер, к клеткам добавляли раствор DAPI. Через 10 минут клетки фотографировали под флуоресцентным микроскопом. Анализ полученных изображений производили с помощью программы EMBL ImageJ.

3.2.6.16. Анализ включения биотин-кадаверинового метки.

Клетки, находящиеся в лунках камеры “Lab-Тек II”, инкубировали с 2 mM N-(5-(аминопентил)биотинамида в среде II при 37°C в течение 90 минут. После этого клетки трижды промывали PBS и обрабатывали буфером для фиксации в течение 15 минут. После фиксации клетки два раза промывали PBS и инкубировали с пермеабилзирующим буфером ещё 15 минут. Далее в лунки на 30 минут добавляли “Serum-free protein block solution” и затем клетки инкубировали в течение 30 минут со стрептавидином, конъюгированным с красителем Alexa Fluor 555. Для отмывки несвязавшегося красителя клетки промывали TBST ещё 6 раз и после этого, отобрав из лунок весь буфер, добавляли к клеткам раствор DAPI. Через 10 минут клетки анализировали под флуоресцентным микроскопом. Наиболее характерные для исследуемой популяции клетки фотографировали.

3.2.6.17. Меченье внутриклеточных органелл.

Для визуализации митохондрий и эндосом клетки трансфецировали плазмидами pTagRFP-mito и pmKate2-endo соответственно.

Для визуализации микровезикулярных телец использовался краситель N-Rh-PE (N-(lissamine rhodamine B sulfonyl)-phosphatidylethanolamine) [126]. Сухой краситель был растворён в абсолютном этаноле и быстро добавлен в охлаждённую на льду среду IV при непрерывном

интенсивном вортиксировании до финальной концентрации 4 мкМ. Далее полученную среду добавили к клеткам, находящимся в лунках камеры “Lab-Tek II”, после чего клетки инкубировались на льду в течение часа. После инкубации клетки промывали 6 раз холодным буфером PBS и инкубировали ещё 3 часа в свежей среде IV при 37 °С.

Для визуализации лизосом использовался реагент LysoTracker Deep Red по инструкции производителя.

3.2.6.18. Исследование метаболической активности клеток.

Значения параметров ECAR (скорость закисления внеклеточной среды) и OCR (скорость поглощения кислорода) были измерены на приборе XF24 Extracellular Flux Analyzer в соответствии с инструкцией производителя. Для этого за 24 часа до эксперимента клетки сажали в картридж “XF 24 FluxPak” по $6 \cdot 10^4$ клеток на лунку в среде IV. Лунки предварительно покрывали ламинином. На следующий день клетки дважды промывали средой “XF minimal basal medium” с добавлением 2мМ L-Глутамина и 11 мМ глюкозы. Затем клетки инкубировали в этой среде 1 час при 37°C в атмосфере без CO₂ и 100% влажности. Далее проводили измерение ECAR и OCR, в ходе которого к клеткам последовательно добавляли Oligomycin A и 2-DG до финальной концентрации 0.5 мг/мл и 100 мМ соответственно. Каждый образец измеряли как минимум в 5ти биологических повторах.

3.2.6.19. Определение скорости движения единичных клеток.

Эксперимент проводили как было описано ранее [127]. Клетки диссоциировали Аккутазой и сажали в безсывороточной CO₂ независимой среде, содержащей B27, EGF и bFGF, на покрытую ламинином микроструктурированную поверхность из полидиметилсульфоксана. Такую поверхность получали с помощью формовки пластика фотолитографически обработанной кремниевой матрицей. Созданная структура пластика близко воспроизводила структуру поверхности паренхимальной стромы головного мозга. Подвижность клеток на такой поверхности была определена с помощью покадровой фотосъёмки клеток с интервалом 10 минут в течение 24х часов. В каждом эксперименте записывались трэки минимум 50ти клеток.

3.2.6.20. Определение подвижности клеток методом “затягивания рубца”.

Клетки диссоциировали Аккутазой и сажали в покрытые ламинином лунки 6-луночного планшета по $1.5 \cdot 10^6$ клеток на лунку. На следующий день в лунке делали две перпендикулярных царапины с помощью носика пипетки на 200 мкл. Через 48 часов царапины фотографировали в световой микроскоп. Эксперимент повторяли минимум в 3х биологических повторах.

3.2.6.21. Проточная цитофлуориметрия.

а) Окраска на поверхностные маркёры CD44 и CD133 проводилась согласно протоколу фирмы производителя антител anti-CD44-APC и anti-CD133-APC. Для анализа использовали $2 \cdot 10^5$ клеток, предварительно диссоциированных Аккутазой.

б) Окраска на альдегид-дегидрогеназную активность проводилась набором “ALDEFUOR” согласно протоколу фирмы производителя. Для анализа использовали $2 \cdot 10^5$ клеток, предварительно диссоциированных Аккутазой.

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

г) Детекция экспонирования фосфатидилсерина на внешнюю поверхность наружной клеточной мембраны проводилась с помощью набора “Alexa Fluor 488 Annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit” по инструкции производителя.

д) Для детекции количества внутриклеточных белков клетки диссоциировали Аккутазой, переносили в 15 мл пробирку и центрифугировали 5 минут при 1000 об/мин. Осадок ресуспендировали в 100 мкл PBS и добавляли 1 мл фиксирующего буфера. Клетки инкубировали 15 мин при комнатной температуре, после чего центрифугировали 5 минут при 1500 об/мин. Затем клетки ресуспендировали в 1 мл пермеабилизирующего буфера и инкубировали ещё 15 минут. Далее клетки центрифугировали 5 минут при 1500 об/мин, ресуспендировали в 100 мкл “Serum-free protein block solution”. Через 30 минут клетки центрифугировали 5 минут при 1500 об/мин и осадок ресуспендировали в 50 мкл буфера TBST, в который были добавлены соответствующие первичные антитела. После часа инкубации к клеткам добавляли 2 мл TBST и снова центрифугировали (5 мин, 1200 об/мин). Осадок ресуспендировали в 2 мл TBST, повторно центрифугировали (5 мин, 1200 об/мин) и ресуспендировали в 50 мкл буфера TBST содержащего 1% BSA и соответствующие вторичные антитела. После часа инкубации к клеткам добавляли 2 мл TBST и центрифугировали (5 мин, 1200 об/мин). Осадок ресуспендировали в 2 мл TBST центрифугировали (5 мин, 1200 об/мин), ресуспендировали в 2 мл PBS, повторно центрифугировали (5 мин, 1200 об/мин) и ресуспендировали в 500 мкл PBS.

е) Для анализа клеточного цикла клетки, выращенные в лунках 24-луночного планшета до плотности 60-80%, снимали с поверхности пластика Аккутазой и переносили в 15 мл пробирку, содержащую 3 мл среды П. Далее клетки центрифугировали 5 минут при 1000 об/мин, ресуспендировали в 5 мл PBS, снова центрифугировали при тех же условиях и ресуспендировали в 1 мл PBS. Затем при непрерывном перемешивании на вортексе к клеткам медленно добавляли предварительно охлаждённый 96% этанол до финальной концентрации спирта 70%. После этого

пробирки инкубировали во льду 15 минут, центрифугировали 5 минут при 1200 об/мин и ресуспендировали клетки в 1 мл буфера PI. Через 40 минут инкубации при 37°C в пробирки добавляли 3 мл PBS, центрифугировали (5 мин, 1200 об/мин, 4°C) и ресуспендировали осадок в 500 мкл PBS.

Окрашенные клетки анализировали на цитометре Attune NxT или FACScan. Для каждого эксперимента записывали минимум 10 000 событий в выбранном регионе. Данные анализировали с помощью программы FlowJo 10.

3.2.6.23. Сортировка клеток.

Клетки окрашивали антителами anti-CD133-APC или набором “ALDEFUOR” по инструкциям производителя после чего собирали 10% наиболее сильно и 10% наиболее слабо окрашенных клеток с помощью клеточного сортера FACSAria III. В каждом эксперименте собирали минимум $2 \cdot 10^5$ клеток. Эффективность сортировки подтверждали последующим qRT-PCR анализом с праймерами на CD133 или ALDH1A3.

3.2.6.24. Фракционирование микротрубочек.

Чтобы определить стабильность микротрубочек при различных условиях в клетках сравнивали содержание полимеризованного тубулина. Для этого клетки выращивали в лунках 24-луночного планшета до плотности 50-70%, промывали дважды PBS, после чего лизировали, добавляя в лунки по 400 мкл MT буфера. Через час инкубации на льду лизат интенсивно пипетировали, переносили в микропробирку и центрифугировали 15 минут при 12 000 g и температуре 4°C. Осадок, содержащий микротрубочки, ресуспендировали в 80 мкл буфера SLB, инкубировали 2 минуты при 95°C, после чего определяли количество тубулина методом иммуноблоттинга.

3.2.6.25. Анализ частоты формирования нейросфер.

Для определения стволовых свойств клеток глиобластомы *in vitro* мы использовали метод анализа частоты формирования нейросфер. Для этого клетки глиобластомы диссоциировали Аккутазой, подсчитывали на счётчике клеток в 4х повторах, после чего готовили суспензию клеток, содержащую 10, 50, 100, 200, 300 и 500 клеток в миллилитре среды IV. Далее каждую из перечисленных суспензий добавляли в 10 лунок 96 луночного планшета по 100 мкл на лунку. Планшеты выдерживали в CO₂ инкубаторе неделю, после чего в лунки добавляли по 100 мкл свежей среды IV. Через 3-7 дней (10-14 дней с момента начала эксперимента) для каждого разведения клеток подсчитывали % лунок, не содержащих нейросферы. За нейросферу считалось скопление из более чем 8ми клеток.

3.2.6.26. SILAC.

Для эксперимента использовались наборы “SILAC Protein Quantitation Kit (Trypsin)” и “SILAC Protein Quantitation Kit (LysC)”. Клетки выращивали на среде DMEM/F12 с контрольными или изотопно-мечеными Лизином (конечная концентрация 100 мг/л; меченый $^{13}\text{C}_6$ L-Лизин-2HCl) и Аргинином (конечная концентрация 200 мг/л; меченый $^{13}\text{C}_6$ $^{15}\text{N}_4$ L-Аргенин HCl), а также 10% диализованной сывороткой. Клетки культивировались на меченой и немеченой средах параллельно в течение более 10 пассажей и более 50 дней, чтобы добиться более чем 98% частоты включения метки. При необходимости клетки диссоциировали трипсином, после чего центрифугировали 5 мин, 1000 об/мин и трижды промывали, добавляя к ним по 10 мл PBS и повторно центрифугируя. Из культуральной среды, полученной от меченых клеток, выращиваемых на двух 75 см² матрасах при 100% плотности, были выделены везикулы по методике, описанной ниже (пункт 3.2.7.2.). Эти везикулы добавляли в три лунки 6-луночного планшета, в которых было посажено по $4 \cdot 10^5$ немеченых клеток на лунку. На следующий день клетки в лунках диссоциировали трипсином, центрифугировали 5 мин, 1000 об/мин и трижды промывали, добавляя к ним по 10 мл PBS и повторно центрифугируя. Полученные осадки клеток лизировали, добавлением 100 мкл буфера RIPA.

Концентрацию белка в лизатах измеряли методом Брэдфорд. Затем равные количества белка из каждого образца (по 250 мкг) были разделены электрофорезом в 9% полиакриламидном геле (20 x 20 см). Электрофорез останавливали, когда фронт красителя опускался ниже концентрирующего геля на 5 см. Далее гель был разделен на 12 фрагментов для проведения трипсинолиза в геле.

Фрагменты геля были нарезаны на более мелкие части (примерно 2 x 2 мм) и помещены в пробирки. Для разрушения дисульфидных связей образцы геля инкубировали в буфере, содержащем 10 mM ДТТ, 100 mM бикарбоната аммония, при температуре 50°C в течение 30 минут. Затем для алкилирования цистеинов был использован буфер, содержащий 55 mM йодацетамида и 100 mM бикарбоната аммония при комнатной температуре в течение 20 минут в темноте. После реакции алкилирования образцы геля были обесцвечены в буфере, состоящем из 50% ацетонитрила, 50 mM бикарбоната аммония и дегидратированы с помощью 100% ацетонитрила. После удаления 100% ацетонитрила образцы были подвергнуты трипсинолизу в геле с добавлением буфера, содержащего 13 нг/мкл трипсина, 50 mM бикарбоната аммония, 5% ацетонитрила. Трипсинолиз проводили в течение 14 часов при температуре 37°C. Полученные пептиды экстрагировали из геля добавлением двух объемов 0,5% трифторуксусной кислоты и инкубировали в течение часа, затем добавляли два объема 50% ацетонитрила и инкубировали в течение часа. После чего пептиды концентрировали в вакуумной центрифуге и повторно

растворяли в 3% ацетонитриле с 0,1% раствором трифторуксусной кислоты перед LC-MS/MS анализом.

3.2.6.27. Сканирующая электронная микроскопия.

Образцы клеток фиксировали в 0.5% растворе глутарового альдегида и покрывали золотом в эмиссионной камере IB-3. Полученный материал просматривали на микроскопе S-570 при ускоряющем напряжении 15 кВ.

3.2.6.28. Атомно-силовая микроскопия.

Для атомно-силовой микроскопии сканировали клетки, на поверхность которых было напылено золото, с помощью прибора Интегра-прима. Сканирование осуществляли в резонансном режиме с использованием кремниевых зондов с резонансной частотой 250 кГц. Частота сканирования – 1 Гц, амплитуда свободных колебаний – 5–10 нМ. АСМ-изображения были получены в условиях воздушного окружения при неконтролируемой влажности.

3.2.7. Методы работы с внеклеточными везикулами.

3.2.7.1. Выделение внеклеточных везикул из культуральной среды клеток глиобластомы.

Клетки были диссоциированы Аккутазой и $4 \cdot 10^7$ клеток глиобластомы сажали на 75 см² матрас в 20 мл среды IV. На следующий день клетки центрифугировали 800 об/мин 5 минут, осадок ресуспендировали в 25 мл свежей среды IV, переносили в новый 75 см² матрас и при необходимости добавляли противоопухолевые препараты. Через 3-5 дней инкубации клетки пипетировали 5 раз пипеткой на 10 мл и центрифугировали 800 об/мин 5 минут. Супернатант переносили в чистую пробирку на 50 мл и центрифугировали 2000g 20 минут при 4°C. Супернатант аккуратно переносили в пробирку для ультрацентрифуги и центрифугировали 120 000g, 70 минут при 4°C. Супернатант аккуратно декантировали.

Для оценки влияния везикул на клетки глиобластомы *in vitro* осадок везикул тщательно ресуспендировали в 1-4 мл свежей среды IV и использовали в дальнейшей работе.

Для всех остальных экспериментов осадок везикул ресуспендировали в 30 мл PBS и повторно центрифугировали 120 000g, 70 минут при 4°C. Супернатант аккуратно декантировали, а осадок везикул тщательно ресуспендировали в 20-30 мкл PBS.

Для нормализации количества везикул между экспериментами содержание везикул определялось по количеству суммарного белка. Для этого 5 мкл раствора везикул смешивали с 5 мкл буфера RIPA, после чего в полученном растворе измеряли концентрацию белка методом Брэдфорда.

3.2.7.2. Выделение внеклеточных везикул из культуральной среды клеток рака яичников.

Клетки были диссоциированы трипсином и $1 \cdot 10^7$ клеток сажали на 75 см^2 матрас в 15 мл среды DMEM/F12 для SILAC, с добавлением диализованной сыворотки и изотопно-меченных лизина и аргинина. При достижении клетками плотности 70-80% клетки дважды промывали 10 мл PBS и в матрас добавляли 20 мл среды DMEM/F12 для SILAC (без сыворотки и без лизина и аргинина). При необходимости к клеткам также добавляли противоопухолевые препараты. Через 3 дня инкубации клетки пипетировали 5 раз пипеткой на 10 мл, среду из матраса отбирали и центрифугировали 2000g 20 минут при 4°C. Далее везикулы выделяли по методике, используемой для клеток глиобластомы.

3.2.7.3. Выделение внеклеточных везикул из плазмы крови.

Везикулы выделяли с помощью набора “Total Exosome Isolation Kit (from plasma)” По инструкции производителя.

3.2.7.4. Выделение внеклеточных везикул из асцитических жидкостей.

К 200 мкл асцита добавляли 1.8 мл PBS и центрифугировали 30 мин 10 000g при 4°C. Супернатант отбирали и центрифугировали 100 000g, 70 минут при 4°C. Для некоторых экспериментов осадок ресуспендировали в 600 мкл 48% раствора сахарозы в PBS. Сверху аккуратно наслаивали 500 мкл 40% раствора сахарозы в PBS и 4 мл 20% раствора сахарозы в PBS. Полученную смесь центрифугировали 200 000g 4 часа при 4°C. Экзосомы, расположенные на границе 48% и 40% слоёв сахарозы, аккуратно отбирали, растворяли в 4 мл PBS, концентрировали с помощью концентратора “Amicon Ultra-4 30,000 NMWL”, растворяли в 4 мл PBS и снова концентрировали с помощью того же концентратора.

3.2.7.5. Анализ траектории движения наночастиц.

Для анализа траектории движения наночастиц (NTA) использовались или везикулы, выделенные из асцитических жидкостей по методике, описанной выше, или культуральная среда, отобранная от клеток глиобластомы. В случае клеток глиобластомы в качестве культуральной среды использовалась среда IV, предварительно профильтрованная через “Amicon Ultra-15 100,000 NMWL” фильтр, чтобы избавиться от контаминации посторонних частиц, присутствующих в среде. NTA проводился на приборе “NanoSight NS500” с лазером 532 нм.

Для анализа траектории движения флуоресцентных частиц в качестве исходного материала использовались везикулы, выделенные из культуральной среды клеток глиобластомы по методике, описанной выше. Осадок везикул был ресуспендирован в 100 мкл PBS и к нему было добавлено 900 мкл фиксирующего буфера. Через 15 минут инкубации к раствору было добавлено 30 мл пермеабилизирующего буфера, после чего образец центрифугировали 120 000g

70 минут при 4°C. Осадок ресуспендировали в 100 мкл “Serum-free protein block solution”, инкубировали 30 минут и добавляли антитела к белку U2AF2, конъюгированные с красителем Alexa Fluor 555. Конъюгацию антител осуществляли с помощью набора “APEX Alexa Fluor 555 antibody labeling kit” по инструкции производителя. Через один час инкубации с мечеными антителами к везикулам добавляли 30 мл PBS и центрифугировали 120 000g, 70 минут при 4°C. Далее осадок везикул был повторно ресуспендирован в 30 мл PBS и снова центрифугировали 120 000g, 70 минут при 4°C. Полученный осадок ресуспендировали в 500 мкл PBS и использовали для NTA на приборе “NanoSight NS500” с лазером 532 нм и светофильтром, пропускающий свет с длиной волны более 560 нм. Все растворы, использованные в этом эксперименте были предварительно профильтрованы через “Amicon Ultra-15 100,000 NMWL” фильтр.

Для обоих экспериментов, описанных выше, видео броуновского движения частиц было записано при комнатной температуре и обработано с помощью программы “NTA analytical software v2.3”. Для каждого образца было произведено по меньшей мере 10 индивидуальных измерений длиной 60 секунд, содержащих запись треков для как минимум 5000 частиц.

3.2.7.6. Подготовка образцов везикул к LC-MS/MS анализу.

Осадок везикул лизировали в 100 мкл буфера О. Концентрацию белка в лизатах измеряли методом Брэдфорд. Затем равные количества белка из каждого образца (по 250 мкг) использовали для LC-MS/MS анализа по методике, описанной выше (пункт 3.2.4.14.).

3.2.7.7. Мечение везикул с помощью Alexa Fluor 488 5-TFP эфира.

Осадок везикул ресуспендировали в 1 мл 0,1 М раствора NaHCO₃ и добавляли к нему 100 мкл 10 мг/мл раствора Alexa Fluor 488 5-TFP в DMSO. Смесь инкубировали 1 час в темноте при комнатной температуре при постоянном медленном перемешивании. Далее раствор переносили в ультрацентрифужную пробирку с 30 мл PBS и центрифугировали 120 000g, 70 минут при 4°C. Полученный осадок ресуспендировали в 30 мл среды DMEM/F12 и снова центрифугировали 120 000g, 70 минут при 4°C. Осадок меченых везикул ресуспендировали в 30 мл PBS и повторно центрифугировали 120 000g, 70 минут при 4°C. Полученный осадок ресуспендировали в 20 мкл PBS и использовали для дальнейших экспериментов.

3.2.7.8. Электронная микроскопия везикул.

Раствор везикул разбавляли в буфере PBS и 4 мкл разбавленной суспензии наносили на покрытую формваром подложку для электронной микроскопии. Через 3 минуты образцы были негативно контрастированы с помощью 1% раствора уранилацетата. Далее везикулы анализировали с помощью электронного микроскопа.

3.2.8. Методы работы с тканями.

3.2.8.1. Приготовление срезов тканей.

Парафиновые блоки тканей и их срезы были любезно приготовлены отделением патологии Университета Огайо и Университета Алабамы США.

Для приготовления замороженных срезов ткани, полученные после хирургии, инкубировали в течение суток в буфере для фиксации клеток при 4°C и медленном вращении. Далее ткань переносили в 15% раствор сахарозы в PBS и инкубировали ещё сутки при 4°C и медленном вращении. Затем ткань переносили в 30% раствор сахарозы в PBS и инкубировали ещё сутки при 4°C и медленном вращении. На следующий день ткань промакивали от излишков жидкости и заливали раствором “Tissue-Tек O.C.T.” в небольшой камере, сделанной из тонкого пластика или фольги. Далее камеру с тканью помещали в ёмкость с метанолом, на дне которой были кубики сухого льда для охлаждения. Когда раствор O.C.T. полностью замерзал, то ткань переносили на -80 °C и хранили там до использования.

Полученный замороженный блок нарезают на пластины толщиной 4-7 мкм на криотоме и помещают их на предметные стёкла, покрытые поли-лизинном.

3.2.8.2. Иммуногистохимия.

Парафиновые срезы опухолей на предметных стёклах были последовательно инкубированы по 5 минут в 100 мл Ксилена, Ксилена, Ксилена, 96% Этанол, 96% Этанол, 96% Этанол, 70% Этанол и воды. Далее стёкла кипятят 15 минут в 100 мл “DakoCytomation target retrieval solution pH 6” и оставляют в этом растворе на 30 минут при комнатной температуре до частичного остывания смеси. Затем стёкла инкубировали 5 минут в 100 мл PBS и помещали ещё на 15 минут в раствор 0.3% H₂O₂ в метаноле. После этого образцы промывают 3 раза по 5 мин в 100 мл TBST. Затем на стёкла наносят по 150 мкл раствора “Serum-free protein block solution”, накрывают парафильмом и оставляют на 30 мин при комнатной температуре. Далее излишки раствора стряхивают и на стёкла наносят по 150 мкл раствора первичных антител в TBST и накрывают парафильмом. Образцы инкубировали ночь при 4°C и 100% влажности. На следующий день стёкла промывают 3 раза по 10 мин в 100 мл TBST, затем на образцы наносят 150 мкл раствора “EnVision+ System–HRP labeled Polymer” и накрывают парафильмом. Стёкла инкубировали час при комнатной температуре, и затем промывают 3 раза по 10 мин в 100 мл TBST. Связывание антител визуализировалось с помощью “DAB peroxidase substrate kit” по инструкции производителя.

3.2.8.3. Иммуногистофлуоресценция.

Замороженные срезы тканей на предметных стёклах нагревали до комнатной температуры и промывали 3 раза по 5 мин в 100 мл PBS. Далее на образцы капали по 500 мкл фиксирующего буфера и инкубировали 10 минут. Фиксирующий буфер смывали раствором PBS и на образцы капали по 500 мкл пермеабилзирующего буфера и инкубировали 10 минут. Затем излишки раствора стряхивали и на стёкла наносили по 150 мкл раствора “Serum-free protein block solution”, накрывали парафильмом и оставляли на 30 мин при комнатной температуре. Далее излишки жидкости стряхивали и на стёкла наносили по 150 мкл раствора первичных антител в TBST и накрывали парафильмом. Образцы инкубировали ночь при 4°C и 100% влажности. На следующий день стёкла промывали 3 раза по 10 мин в 100 мл TBST, затем на образцы наносили 150 мкл раствора вторичных антител в TBST и накрывали парафильмом. Стёкла инкубировали час при комнатной температуре, и затем промывали 3 раза по 10 мин в 100 мл TBST. Затем на образцы капали раствор DAPI. Через 10 минут ткани анализировали под флуоресцентным микроскопом.

3.2.8.4. TOF-SIMS анализ.

Для TOF-SIMS анализа использовали или парафиновые срезы тканей, окрашенные антителами, конъюгированными с золотыми наночастицами, или неокрашенные замороженные срезы тканей.

В случае парафиновых срезов образцы последовательно инкубировали по 5 минут в 100 мл Ксилена, Ксилена, Ксилена, 96% Этанол, 96% Этанол, 96% Этанол, 70% Этанол и воды. Далее стёкла кипятили 15 минут в 100 мл “DakoCytomation target retrieval solution pH 6” и оставляли в этом растворе на 30 минут при комнатной температуре до частичного остывания смеси. Затем образцы промывали 3 раза по 5 мин в 100 мл TBST. Затем на стёкла наносили по 150 мкл раствора “Serum-free protein block solution”, накрывали парафильмом и оставляли на 30 мин при комнатной температуре. Далее излишки жидкости стряхивали и на стёкла наносили по 150 мкл раствора конъюгированных с золотыми наночастицами первичных антител в TBST и накрывали парафильмом. Образцы инкубировали ночь при 4°C и 100% влажности. На следующий день стёкла последовательно инкубировали по 10 минут в 100 мл TBST, TBST, PBS, фиксирующего буфера, PBS, воды “Milli-Q”, воды “Milli-Q”, воды “Milli-Q” и воды “Milli-Q”. Далее стёкла высушивали в вакууме и использовали для TOF-SIMS анализа.

В случае замороженных срезов образцы промывали 5 раз по 10 мин водой “Milli-Q”, высушивали в вакууме и использовали для TOF-SIMS анализа.

В процессе TOF-SIMS анализа были использованы ионы трех видов: одноатомные ионы Bi^+ , трехатомные кластеры Bi_3^+ и одноатомные ионы Cs^+ . Энергия ионов составляла 30 кэВ (Bi^+ и Bi_3^+) и 1 кэВ (Cs^+). Для компенсации поверхностного заряда, накапливающегося во время эксперимента, использовали электронную пушку.

Образцы анализировали в двух режимах: спектроскопическом и режиме химического картирования (имиджинга). В спектроскопическом режиме ионный пучок фокусировали до диаметра 5 мкм. Длительность импульса не превышала 20 нс. Измерения проводили в областях различных размеров с контролем плотности дозы облучения первичных ионов. Во всех экспериментах эта доза не превышала 10^{12} ионов/см². В режиме имиджинга пучок первичных ионов фокусировался в плоскости объекта до 500 нм. Длительность импульса составляла около 60 нс. Измерения проводили в области 250×250 мкм с разрешением 512×512 точек. Доза облучения первичными ионами составляла $4.5 \cdot 10^{12}$ ионов/см². «Травление» поверхности образца осуществляли ионами Cs^+ в течение 30 с.

3.2.8.5. Выделение наружной митохондриальной мембраны.

Для выделения наружной митохондриальной мембраны печень от 4х мышей, содержащихся без еды в течение 18 часов, была промыта буфером I, измельчена на куски размером 2-4 мм и гомогенизирована тefлоновым пестиком в стеклянной ступке в 10 кратном объеме буфера I. Все операции проводились на льду. Гомогенат центрифугировали 10 минут 500g, после чего супернатант отбирали и центрифугировали 10 минут при 9000g. Супернатант отбирали и поверхность осадка аккуратно трижды промывали небольшим объемом буфера I. Осадок ресуспендировали в буфере I и раствор центрифугировали 10 минут 500g, после чего супернатант центрифугировали 10 минут при 9000g. Осадок ресуспендировали в буфере I и повторно центрифугировали 10 минут при 9000g. Супернатант отбирали и поверхность осадка аккуратно трижды промывали небольшим объемом буфера I. Осадок ресуспендировали в 35 мл буфера J и инкубировали 20 минут во льду. Раствор центрифугировали 20 минут 35000g. Осадок ресуспендировали в 35 мл буфера J, центрифугировали 15 минут 1900g. Супернатант аккуратно отбирали и центрифугировали 20 минут 35000g. Жёлто-коричневый осадок, полученный после центрифугирования, представлял собой фракцию НММ. Белки НММ были солюбилизованы в буфере М с добавлением 0.5 мМ DTT.

3.2.8.6. Подготовка асцитических жидкостей для анализа

Асцитические жидкости центрифугировали 1900g 15 минут при комнатной температуре и хранили при -80 °С. Перед анализом образцы размораживали и центрифугировали 16 000g в течение 30 минут при 4 °С.

3.2.9. Методы работы с животными.

3.2.9.1. Имплантация человеческой глиобластомы в мозг иммунодефицитным мышам.

Клетки глиобластомы диссоциировали Аккутазой, дважды промывали PBS и подсчитывали на счётчике клеток. Далее объём жидкости, содержащий нужное количество клеток, переносили в 15 мл пробирку, стенки которой были заранее покрыты BSA (для этого в пробирку на 5 минут добавляли 2 мл 1% стерильного раствора BSA в PBS). Клетки центрифугировали 1000 об/мин 5 мин, после чего ресуспендировали в нужном объёме PBS и переносили в 200 мкл стерильную пробирку, находящуюся на льду.

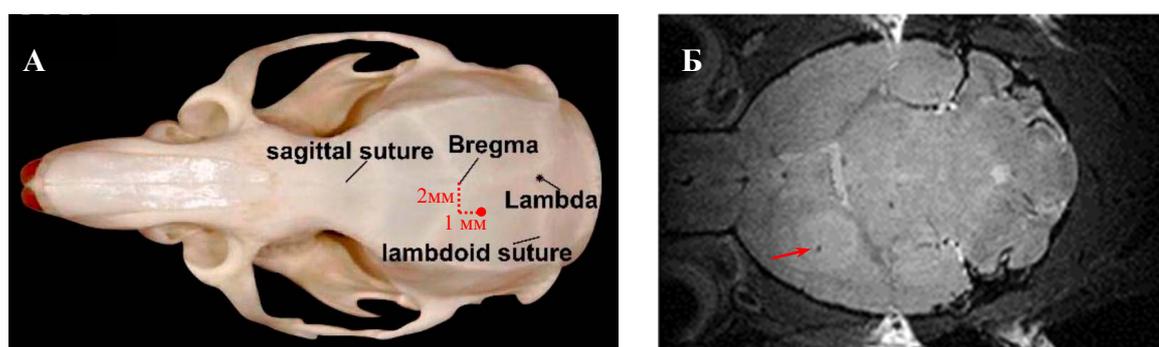


Рисунок 36. *Схема введения опухолевых клеток в мозг иммунодефицитным мышам. А – Обозначение точки введения опухолевых клеток (красная) в черепе мыши. Б – МРТ изображение мозга мыши, которой 2 месяца назад были введены опухолевые клетки. На снимке хорошо заметен след от иглы (чёрная точка) и опухоль вокруг него (просветлённая область).*

Для экспериментов использовали NOD scid или NU/J иммунодефицитных мышей возрастом 6-10 недель. Мышей анестезировали, вводя внутривенно смесь Ксилазина-Кетамина. Животное фиксировали на стереотактическом аппарате, аккуратно разрезали кожу на голове и сверлом диаметром 1 мм просверливали отверстие в черепе, как указано на **рисунке 36А**. Далее клетки глиобластомы ресуспендировали пипеткой на 20 мкл и микрошприцом отбирали 4 мкл клеток. Затем иглу шприца опускали на 3 мм внутрь просверленного отверстия в черепе и в течение 2х минут медленно вводили в мозг мыши 2-3 мкл суспензии клеток глиобластомы, таким образом, чтобы в животное попало $1 \cdot 10^5$ - $5 \cdot 10^5$ клеток. Далее шприц медленно вынимали из мозга животного со скоростью 1 мм в минуту. Отверстие в черепе заделывали хирургическим воском, а кожу на голове зашивали хирургическими нитками. До окончания действия анестезии животных выдерживали на подогреваемой до 30-36 °С поверхности.

Через несколько недель-месяцев, когда у животных развивались явные невропатологические симптомы вследствие роста опухоли, мышам вводили двойную дозу анестезии, перфузировали 10 мл PBS и затем 10 мл фиксирующего буфера, после чего мозг с опухолью использовали для дальнейшего анализа.

3.2.9.2. Детекция биолюминесценции в живых мышах.

Для того чтобы следить за ростом опухоли в живых мышах, животным в мозг вводили клетки глиобластомы, стабильно экспрессирующие люциферазу. Для этого клетки заражали лентивирусными частицами, созданными с помощью плазмиды рHAGE PGK-GFP-IRES-LUC-W. Через различные промежутки времени после инъекции опухолевых клеток мышей анестезировали с помощью изофлюрана и вводили им внутривенно 2.5 мг/100 мкл раствора “XenoLight D-luciferin”. После этого изображения биолюминесценции получали с помощью прибора IVIS 100.

3.2.10. Компьютерные методы анализа данных.

3.2.10.1. Анализ результатов MALDI-TOF масс спектрометрии.

Данные были обработаны при помощи программы Flex Analysis 3.3, а пики автокаталитического расщепления трипсина, содержащиеся в образцах, были использованы для калибровки используемого метода. Для анализа были использованы следующие параметры: точность определения массы - 100 ppm, база данных SwissProt, таксономическая категория Человек, допущение одного пропущенного сайта специфического расщепления трипсином.

3.2.10.2. Анализ результатов LC-MS/MS.

Данные были конвертированы в .mgf файл с помощью программы ProteinPilot (version 4.5). Для этой процедуры ProteinPilot был запущен в режиме идентификации со следующими параметрами: алкилирование цистеинов йодацетамидом, гидролиз трипсином, прибор TripleTOF 5600 и поиск белков, детектируемых с порогом 95.0%, по базе данных SwissProt, таксон HomoSapiens (<http://www.uniprot.org> с 176397 элементами). Для более тщательной идентификации белков был сгенерирован список пиков, который был проанализирован программами MASCOT (версия 2.5.1) и X! Tandem (CYCLONE, 2013.2.01) с использованием базы данных SwissProt, таксон HomoSapiens (версия 2013 03) Проверка статистической достоверности идентификаций осуществлялась на основании поиска по реверсированной базе данных белковых последовательностей (decoy reversed database). Допустимые отклонения от массы иона предшественника и фрагмента были 20 ppm и 0.04 Да соответственно. Параметры поиска по базе данных были следующие: допущение одного пропущенного сайта

специфического расщепления трипсином, фиксированная модификация – карбамидометилирование (C), и динамическая модификация – окисление (M). Для программы X! Tandem были также выбраны параметры, позволяющие осуществлять быструю проверку ацетилирования N-концевых остатков белков, потери молекулы аммиака N-концевых глутаминов пептидов, или потери молекулы воды N-концевой глутаминовой кислоты пептидов. Результирующие файлы были загружены в программу Scaffold 4 (версия 4.2.1) для валидации и мета-анализа. В качестве достоверно идентифицированных пептидов рассматривались компоненты, попадающие по уровню достоверности в массив идентификаций с Global FDR 5%. Список белков – предшественников составлялся на основании списка достоверно идентифицированных пептидов (FDR 5%).

3.2.10.3. Анализ данных экспрессии генов, полученных с помощью ДНК микрочипов.

Результаты, полученные с помощью микрочипов, были обработаны и нормализованы с помощью программы “Affymetrix Expression Console software V1.3.1” и метода “RMA sketch”. Пробы микрочипов исключали, если они не позволяли достичь значения $p < 0.05$. GSEA анализ проводили с помощью программы clusterProfiler. Тепловые карты и кластеризация были получены с помощью программы “Cluster 3.0”. Дистанция определялась с помощью коэффициента корреляции Пирсона. Анализ обогащения генов проводился с помощью онлайн сервиса STRING.

3.2.10.4. Анализ альтернативного сплайсинга.

Риды секвенирования в формате fastq были импортированы в “galaxy” (galaxy.uabgrid.uab.edu). Контроль качества проводился с помощью обрезки концов ридов с использованием “read quality score”. Последовательности адаптеров были удалены, после чего риды были наложены на геном человека (hg19) с помощью алгоритма “STAR aligner”. Полученные .bam файлы использовались для анализа альтернативного сплайсинга после удаления ПЦР дубликатов с помощью “samtools”. Анализ альтернативного сплайсинга производился с помощью программы “AS Detector”. События альтернативного сплайсинга были ранжированы по скорректированному значению p . 10% наиболее статистически значимых событий использовались для дальнейшего анализа. События альтернативного сплайсинга, обнаруженные во всех трёх сравнениях анализировали с помощью онлайн сервиса “STRING” и базы данных “GO Biological Process”.

3.2.10.5. Статистический анализ.

Статистический анализ проводился с помощью программы “GraphPad Prism”. Для определения статистической значимости данных большинства экспериментов использовался t -

тест, для определения статистической значимости кривых Каплан-Майера использовался логарифмический ранговый тест. Различия считались статистически достоверными при $p < 0.05$. Планки погрешностей на всех рисунках показывают стандартное отклонение.

4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

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

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

4.1.1. Изучение ингибиторов каспазезависимого апоптоза.

Среди всех путей апоптоза наиболее быстро происходит активация каспазезависимого механизма клеточной гибели, который индуцируется уже через 15-30 минут после некоторых типов повреждения ДНК. Первым этапом этого процесса является диссоциация белка AIF от наружной митохондриальной мембраны (НММ).

Ранее было показано, что AIF взаимодействует с поверхностью НММ, не встраиваясь в липидный бислой [128]. Учитывая специфичность связывания AIF с НММ, а также то, что это взаимодействие ингибируется высокими концентрациями NaCl, мы предположили, что AIF локализуется на поверхности НММ благодаря связыванию с неким белком-адаптером, заякоренным на НММ. Чтобы определить этот белок мы изучили взаимодействия рекомбинантного AIF с белками, выделенными из НММ. Для этого с помощью ультрацентрифугирования из печени мыши были очищены белки НММ. Далее фракция солюбилизованных белков НММ была пропущена через сорбент с иммобилизованным контрольным белком или с полноразмерным AIF (fAIF). После этого связавшиеся белки были идентифицированы с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии. Один из белков, способных взаимодействовать с AIF, но не с контрольным рекомбинантным белком был определён как

Морталин (**Рис. 37**) - представитель семейства белков теплового шока (Hsp), ассоциированный с внешней поверхностью НММ [129].

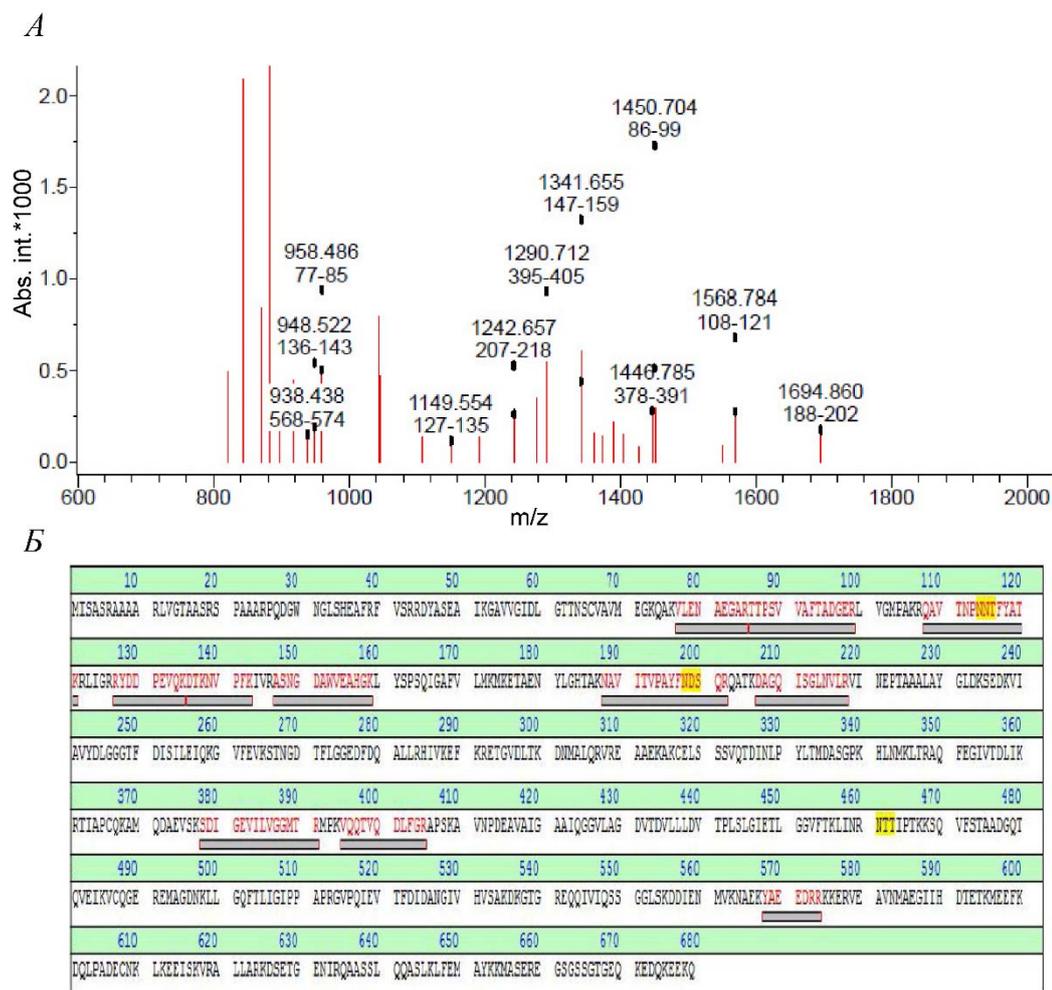


Рисунок 37. Определение белка НММ, взаимодействующего с полноразмерным AIF. А – Масс-спектр белков НММ, взаимодействующих с AIF. Указаны пептиды, относящиеся к белку Морталин. В - Полная аминокислотная последовательность Морталина и пептиды, идентифицированные с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии

Белок Морталин содержит два функциональных домена. С N-конца располагается АТР связывающий домен (1-443 а.к.), а с С-конца пептид, связывающий домен (444-581 а.к.) [130]. Чтобы определить, какой из этих доменов важен для взаимодействия с AIF мы проверили связывание fAIF с N- и С- концевыми фрагментами Морталина (1-433 а.к. и 433-666 а.к. соответственно, **Рис. 38А**). Для этого мы сконструировали плазмидные векторы, кодирующие фрагменты Морталина, несущие гексагистидиновый участок, а также плазмиду, кодирующую fAIF с последовательностью Halo-tag. Соответствующие рекомбинантные белки были выделены из бактерий (**Рис. 38Б**), после чего к магнитным частицам с иммобилизованным на них fAIF

добавляли очищенные фрагменты Морталина. После инкубации и последующих промывок, связавшиеся с сорбентом белки были элюированы и разделены в полиакриламидном геле (**Рис. 38В**). По результатам электрофореза видно, что фрагмент Mort II (433-666 а.к.) взаимодействует с fAIF *in vitro*, а фрагмент Mort I (1-433 а.к.) к такому взаимодействию не способен.

После идентификации фрагмента Морталина, способного связываться с AIF, мы решили определить участок AIF необходимый для данного взаимодействия. С этой целью мы создали плазмиды, кодирующие полноразмерный AIF (fAIF), а также процессированный AIF (apoAIF; 103-613 а.к., **Рис. 38А**), который возникает при индукции апоптоза и после диссоциации от митохондриальной мембраны перемещается в ядро клетки. Оба белка содержали гексагистиридиновый участок на своём N-конце. Выделенные рекомбинантные фрагменты AIF были иммобилизованы на магнитных частицах, после чего к частицам добавляли фракцию солюбилизованных белков НММ (содержащую Морталин). После инкубации и последующих промывок, связавшиеся белки были элюированы и разделены в полиакриламидном геле. Наличие Морталина определялось с помощью иммуноблоттинга с первичными антителами на Морталин. Из результатов иммунодетекции (**Рис. 38Г**) видно, что эндогенный Морталин взаимодействует с полноразмерным рекомбинантным fAIF *in vitro*, и не взаимодействует с apoAIF. Такой результат хорошо согласуется с ранее опубликованными данными о том, что apoAIF не способен локализоваться на НММ [128].

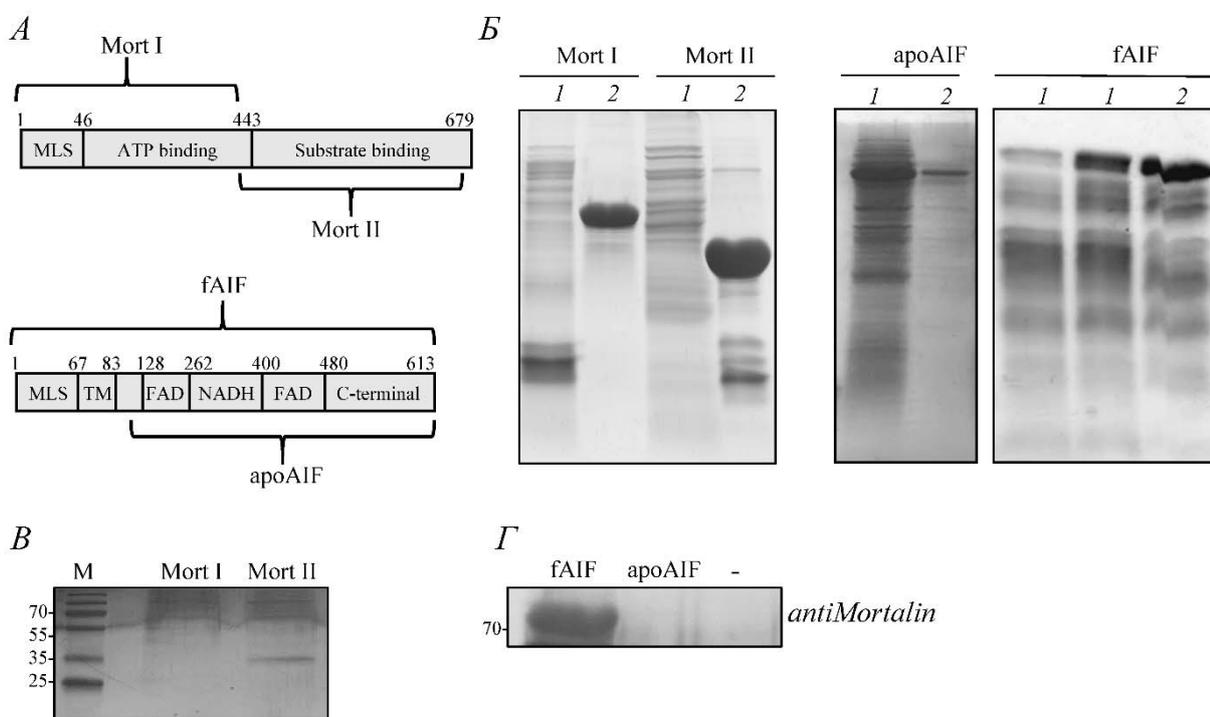


Рисунок 38. Взаимодействие AIF и Морталина *in vitro*. А – Схема белков Морталин и AIF с указанием рекомбинантных фрагментов, которые были использованы в данной работе. Б – Электрофореграмма, демонстрирующая чистоту выделения рекомбинантных фрагментов

Морталина и AIF из бактерий *E. Coli* (1- до оптимизации условий экспрессии и выделения; 2- после оптимизации условий экспрессии и выделения). В – Электрофореграмма, демонстрирующая взаимодействие рекомбинатных фрагментов Морталина с полноразмерным AIF, иммобилизованным на магнитных частицах. Г – Иммунодетекция эндогенного Морталина, эллированного с магнитных частиц, на которых были иммобилизованы рекомбинантными фрагментами AIF.

Чтобы подтвердить, что AIF может взаимодействовать с Морталином не только *in vitro*, но и внутри живой клетки *in vivo* мы использовали метод бимолекулярной комплементации флуоресценции (BiFC). Для этого мы создали плазмиды, кодирующие Морталин, соединённый с N-концевой частью YFP (Mort-YN), и fAIF, несущий C-концевой фрагмент YFP (YC-AIF) (**Рис. 39А**). Этими плазидами были котрансфицированы клетки глиобластомы человека линии U87-MG. Кроме того, в качестве положительного контроля клетки котрансфицировались плазидами, кодирующими YC-AIF и белок XIAP с N-концевой частью YFP (YN-XIAP). Ранее было показано, что AIF взаимодействует с XIAP в митохондриях [131]. В качестве отрицательного контроля клетки котрансфицировали плазидами, кодирующими YC-AIF и свободную N-концевую часть YFP (YN). Через 24 часа после трансфекции с помощью конфокального микроскопа было получено изображение клеток, коэкспрессирующих пары исследуемых белков. Как видно из **рисунка 39А**, в клетках коэкспрессирующих YC-AIF и Mort-YN, а также в клетках коэкспрессирующих YC-AIF и YN-XIAP наблюдается яркая флуоресценция YFP. Такой результат подтверждает, что AIF и Морталин действительно взаимодействуют друг с другом *in vivo*.

Получив результаты, говорящие о том, что AIF способен взаимодействовать с Морталином *in vitro* и *in vivo*, мы исследовали, как меняется интенсивность этого взаимодействия на ранних стадиях апоптоза. Для этого клетки линии U87-MG обрабатывались цисплатином [Pt(NH₃)₂Cl₂] - широко используемым препаратом для химиотерапии многих типов опухолей [132]. Чтобы определить концентрацию цисплатина, вызывающую апоптоз в большинстве клеток, мы оценили эффект от различных количеств этого препарата на жизнеспособность клеток с помощью окрашивания Аламаровым голубым. Исходя из данных, представленных на **рисунке 39Б**, для индукции апоптоза нами была выбрана концентрация цисплатина 60 мМ. Далее, клетки обрабатывались цисплатином в течение 24 часов, после чего клетки лизировали, и лизат инкубировался с магнитными частицами с иммобилизованным на них рекомбинантным Морталином. В качестве контроля использовался лизат нормальных, не обработанных цисплатином клеток. После инкубации и последующих промывок, связавшиеся белки были

элюированы и разделены в полиакриламидном геле. Наличие AIF определялось с помощью иммуноблотинга с первичными антителами на этот белок. Из **рисунка 39В** видно, что рекомбинантный Морталин взаимодействует с эндогенным полноразмерным AIF в нормальных клетках, но при индукции апоптоза интенсивность этого взаимодействия заметно снижается.

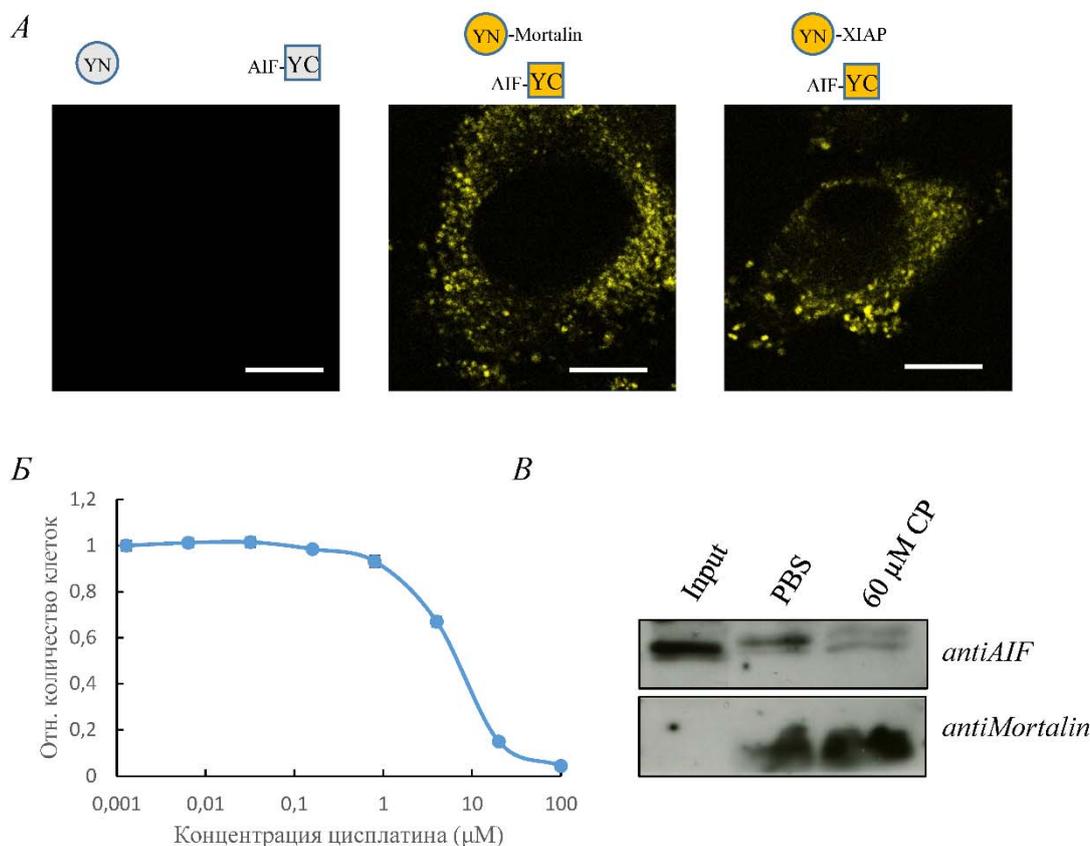


Рисунок 39. Взаимодействие Морталина и AIF в живой клетке. А - Флуоресценция YFP в клетках U87-MG, коэкспрессирующих YC-AIF и YN (слева), YN-Mort (в центре) или YN-XIAP (справа). Б - Выживаемость клеток U87-MG, обработанных различными концентрациями цисплатина. В – Иммунодетекция эндогенного AIF из лизатов клеток U87-MG, обработанных 60 μM цисплатина. Лизат пропускали через магнитные частицы с иммобилизованным рекомбинантным Морталином, после чего связавшиеся белки элюировали и разделяли в полиакриламидном геле. В качестве контроля иммобилизации белка также проводилась иммунодетекция рекомбинантного Морталина.

Для того чтобы подтвердить этот результат мы использовали метод “in situ proximity ligation assay” (PLA), а также другой широко используемый индуктор апоптоза - стауроспорин. Аналогично предыдущему эксперименту мы определили концентрацию препарата, вызывающую апоптоз в большинстве клеток (**Рис. 40А**). Далее, используя PLA анализ, мы

изучили, как изменяется интенсивность взаимодействия эндогенных AIF и Морталина после добавления стауроспорина (Рис. 40Б и 40В). Полученные нами результаты показывают, что после индукции апоптоза, интенсивность взаимодействий Морталин-AIF значительно снижается ($p < 0,05$), что согласуется с результатами предыдущего эксперимента.

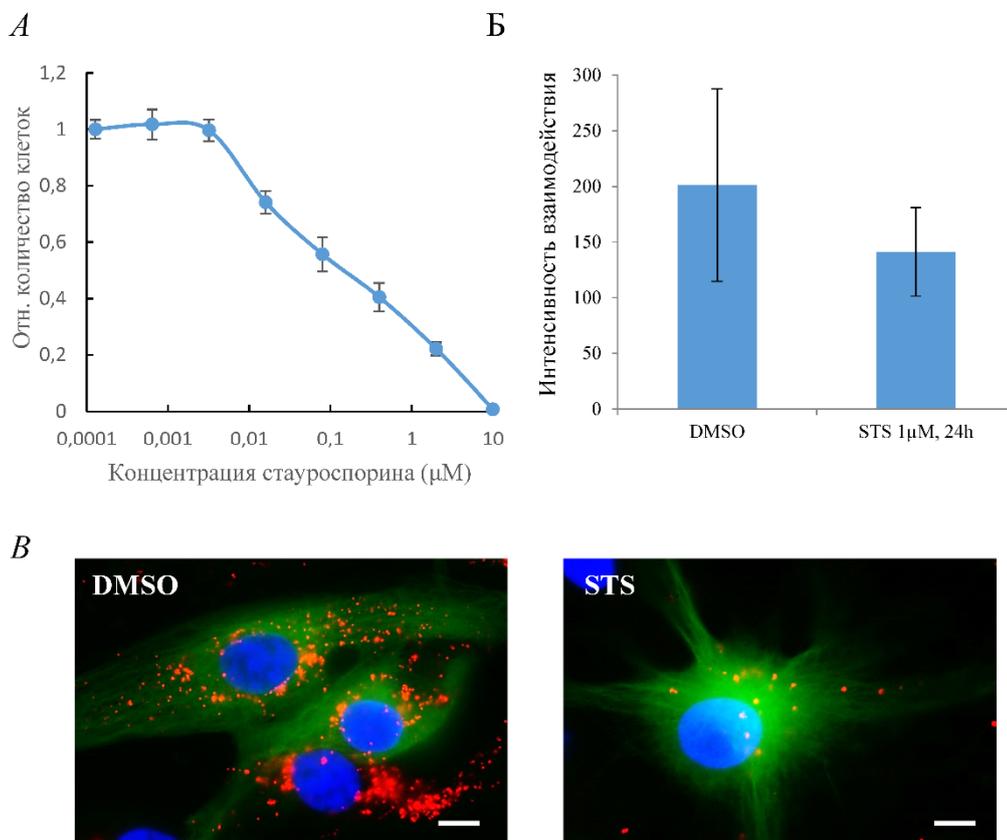


Рисунок 40. Взаимодействие Морталина и AIF в фиксированных клетках. А - Выживаемость клеток U87-MG, обработанных различными концентрациями стауроспорина. Б - Влияние стауроспорина на интенсивность взаимодействия AIF и Морталина, измеренную методом PLA анализа в клетках линии U87-MG ($p < 0,05$). В - Визуализация взаимодействия белков Морталина и AIF методом PLA после обработки 1 μM стауроспорина (STS) или DMSO.

Исходя из всех результатов, описанных выше, можно предположить, что повышенное количество Морталина в раковых клетках может способствовать усилению связывания AIF с НММ, ведущему к более высокой устойчивости клеток к апоптозу и, как следствие, к более агрессивному фенотипу опухоли. Чтобы проверить связь экспрессии Морталина с выживаемостью пациентов мы использовали публично доступную базу данных Rembrandt, содержащую информацию об экспрессии генов и времени жизни пациентов с опухолями головного мозга. Анализ этой базы данных (Рис. 41) показал, что более высокая экспрессия

Морталина статистически значимо коррелирует с плохой выживаемостью пациентов с глиобластомой.

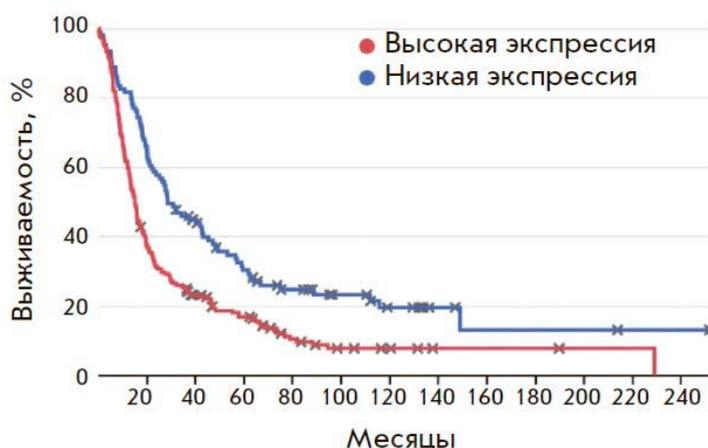


Рисунок 41. Кривая Каплан-Майера, показывающая выживаемость пациентов с глиобластомой, разделённых на 2 группы на основании экспрессии Морталина, данные получены из базы данных Rembrandt. $p = 0,00002$.

Таким образом, в этой части работы мы впервые показали, что во взаимодействии AIF с НММ участвует представитель семейства белков теплового шока – Морталин, связывающийся с участком AIF 1-102 а.к.. Интересно, что вторая стадия каспазезависимого апоптоза - перемещение AIF из цитопазмы в ядро, также ингибируется белком теплового шока Hsp70, который, находясь в цитоплазме, связывается с участком AIF 150-228 а.к. [30]. Можно предположить, что белки теплового шока являются важными, и на сегодняшний день единственно известными, ингибиторами каспаз-независимого пути апоптоза. Белок Морталин может закреплять AIF на НММ и препятствовать запуску программы апоптоза, однако, если диссоциация AIF от НММ всё-таки произошла, то белок Hsp70 ингибирует транслокацию AIF в ядро. Эта гипотеза хорошо согласуется с недавно опубликованными данными о том, что Морталин способен препятствовать апоптозу, закрепляя на внешней поверхности НММ другой важнейший белок, регулирующий ответ клетки на стресс- HIF1a [129]. В соответствии с перечисленными выше результатами мы показали, что повышенная экспрессия Морталина коррелирует с агрессивным фенотипом раковых клеток и, как следствие, является плохим прогностическим фактором для пациентов с опухолями головного мозга [133].

4.1.2. Изучение ингибиторов каспаззависимого апоптоза.

Активация AIF индуцируемого апоптоза наблюдается лишь в некоторых весьма специфических условиях. Более распространённым вариантом клеточной гибели, по-видимому, является классический каспаззависимый путь апоптоза. На первом этапе данного процесса происходит выход проапоптотических факторов (Цитохром С и Smac/DIABLO) из межмембранного пространства митохондрий. Чтобы защитить себя от этих белков, опухолевые клетки экспрессируют избыточные количества белка Survivin. Ранее предполагалось, что в клетке Survivin находится только в виде димера, а мономер этого белка не имеет биологических функций [48, 49]. Однако в настоящее время накапливаются данные о том, что в некоторых процессах участвует мономер, а не димер белка Survivin. Так, например, только мономер белка Survivin входит в состав комплекса белков-пассажира хромосом (CPC) [51], и только в форме мономера Survivin транспортируется из ядра в цитоплазму [50]. Наконец, недавно полученные результаты говорят в пользу того, что в клетках существует специальный механизм регуляции равновесия между димерной и мономерной формами белка Survivin благодаря его ацетилированию по различным остаткам лизина [54]. Заинтересовавшись такими данными, мы приняли решение исследовать роль мономера белка Survivin в регуляции апоптоза.

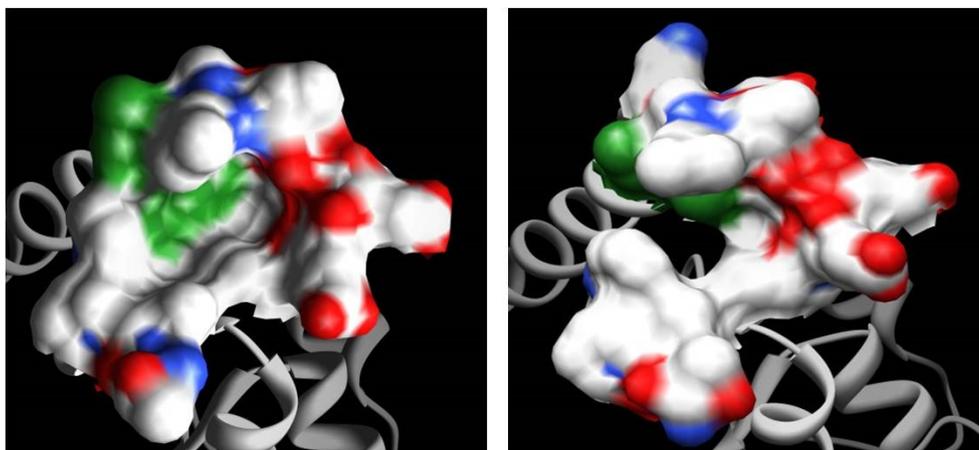


Рисунок 42. Структура белка *Survivin*^{WT} и *Survivin*^{F101A/L102A}. Модель электростатической поверхности участка димеризации белка *Survivin*^{WT} (А) [PDB ID: 1E31] и *Survivin*^{F101A/L102A} (Б). Положительно заряженные области обозначены синим цветом, отрицательно заряженные области обозначены красным цветом, 101я и 102я аминокислоты выделены зелёным цветом.

В качестве модели мономерной формы белка Survivin, нами был выбран недавно описанный мутант, имеющий две аминокислотные замены на участке димеризации (*Survivin*^{F101A/L102A}) [50]. Как упоминалось ранее (см. раздел 2.1.2.3.), димеризация белка Survivin происходит за счёт того, что лейцин 98 одной молекулы заходит в гидрофобный карман,

образованный второй молекулой (лейцин 6, триптофан 10, фенилаланин 93, фенилаланин 101 и лейцин 102). Используя ранее определённую структуру белка Survivin дикого типа (Survivin^{WT}) в качестве основы [134], нами была создана компьютерная модель димеризационной поверхности мутантного белка Survivin^{F101A/L102A}. Как видно из **рисунка 42**, замена 101й и 102й аминокислот на аланин приводит к разрушению гидрофобного кармана, необходимого для формирования гомодимеров. По этой причине Survivin^{F101A/L102A} *in vitro* и *in vivo* существует исключительно в виде мономеров [50]. Важно подчеркнуть, что 101я и 102я аминокислоты находятся вне высококонсервативного VIR домена, и поэтому их замена, вероятнее всего, не может оказывать значительного эффекта на пространственное строение всего белка.

Так как в настоящее время основной функцией белка Survivin считается защита опухолевых клеток от запрограммированной клеточной гибели, то мы в первую очередь исследовали антиапоптозную активность димерной и мономерной форм белка Survivin. Существует как минимум три основных механизма того, как Survivin защищает клетку от апоптоза (см. раздел 2.1.2.2.): во-первых, Survivin способен ингибировать проапоптозный белок Smac/DIABLO, выходящий из межмембранного пространства митохондрий на первых стадиях апоптоза, во-вторых, Survivin защищает от убиквитинилирования и повышает стабильность антиапоптозного белка XIAP, и, наконец, белок Survivin препятствует перемещению в ядро белка AIF, о котором речь шла ранее. В дополнение к этим, наиболее изученным гипотезам, существуют и данные о том, что Survivin защищает раковые клетки от действия препаратов таксанового ряда благодаря его способности регулировать стабильность микротрубочек.

В первом эксперименте мы исследовали способность мономера белка Survivin ингибировать проапоптозный белок Smac/DIABLO, проанализировав взаимодействия соответствующих рекомбинантных белков, выделенных из *E.coli* (**Рис. 43А**), а также используя метод регистрации FRET с техникой фотообесцвечивания акцептора (**Рис. 43Б**). Полученные данные свидетельствуют о том, что *in vitro* и *in vivo* Survivin^{F101A/L102A} может взаимодействовать со зрелым белком Smac/DIABLO, тогда как Smac/DIABLO, не имеющий IBM мотива (без первых 8ми аминокислот; Δ63Smac), в аналогичных условиях не способен связываться с белком Survivin.

Для более детального исследования роли мономера белка Survivin в регуляции апоптоза, мы создали клеточные линии стабильно экспрессирующие Survivin^{WT} или один из перечисленных мутантов: Survivin^{F101A/L102A}, Survivin^{D53A} или Survivin^{D53A/F101A/L102A}, несущие циановый флуоресцентный белок на своём N-конце. Survivin^{D53A} – наиболее хорошо охарактеризованный доминантно негативный мутант белка Survivin, образующий нефункциональные гетеродимеры с эндогенным белком Survivin и вызывающий гибель раковых клеток [49]. Survivin^{D53A/F101A/L102A} – мутант, впервые созданный в нашей лаборатории и имеющий

не только замену 53й аминокислоты, нарушающую структуру В1R домена, но и замены 101ой и 102ой аминокислот, которые, как мы предполагаем, по аналогии с Survivin^{F101A/L102A}, не позволяют этому белку формировать димеры. Для определения эффекта перечисленных выше мутантов белка Survivin на апоптоз, мы обрабатывали полученные клеточные линии двумя противоопухолевыми препаратами - цисплатином или стауроспорином (ингибитор широкого спектра киназ [135, 136]), после чего погибающие клетки детектировались по активации каспазы-3 или по экспонированию фосфатидилсерина на внешнюю поверхность клеточной мембраны.

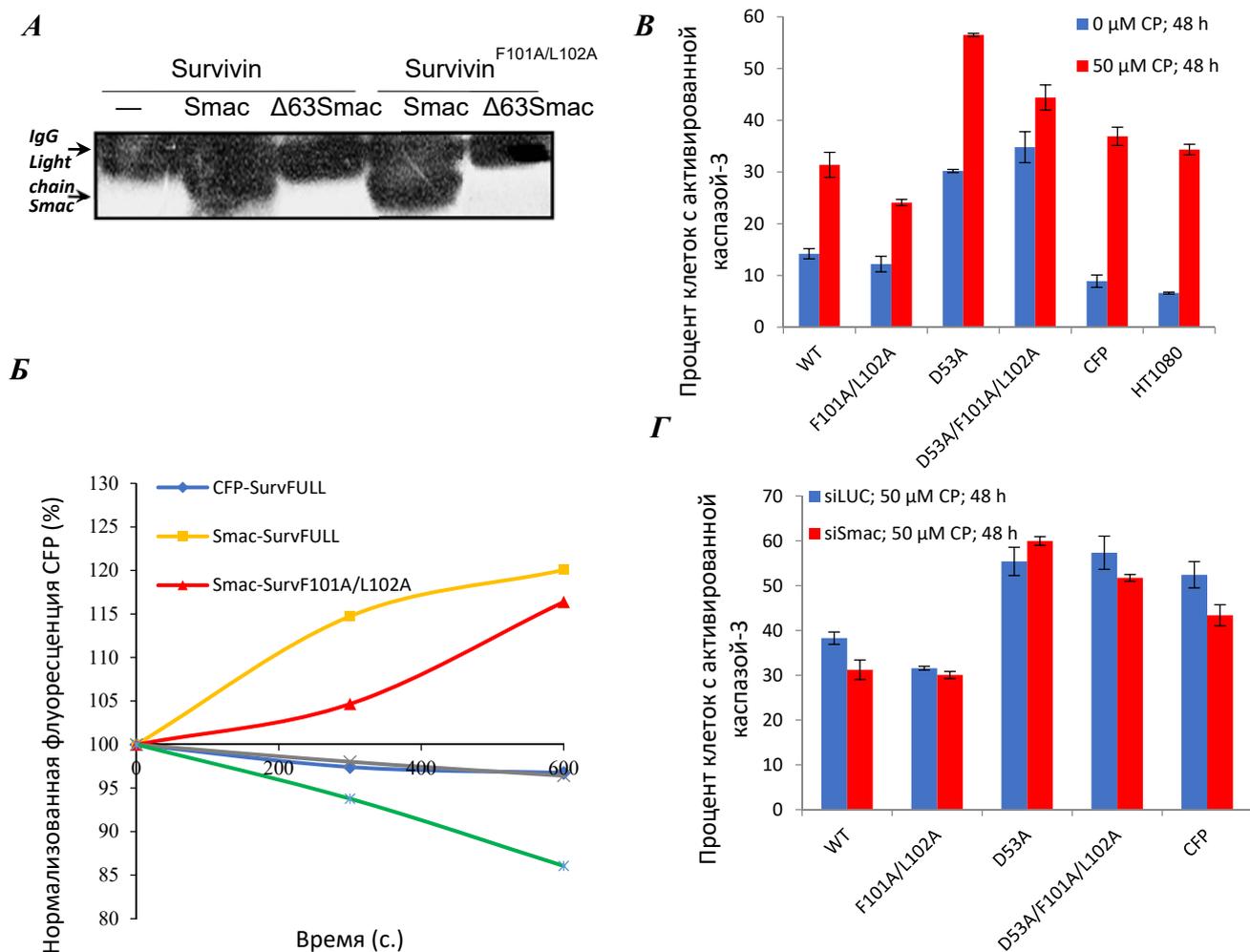


Рисунок 43. А - Иммунодетекция Survivin^{WT} и Survivin^{F101A/L102A} в образцах, полученных при элюции белков, связавшихся с иммобилизованным Smac/DIABLO и его делеционным мутантом. Б - Графики зависимости интенсивности флуоресценции CFP от времени фотообесцвечивания YFP в клетках, коэкспрессирующих YFP-Survivin^{WT} или YFP-Survivin^{F101A/L102A} и CFP, Smac/DIABLO-CFP или Δ63 Smac/DIABLO-CFP. В - Активация каспазы-3 до и после обработки цисплатином клеток, экспрессирующих различные мутанты Сурвивина. Г - Влияние миРНК к Smac/DIABLO на активацию каспазы-3, вызванную цисплатином, в клетках, экспрессирующих различные мутанты белка Survivin.

Из результатов, приведённых на **рисунке 43В**, следует, что экспрессия мутантного белка Survivin^{F101A/L102A} наиболее эффективно защищает опухолевые клетки от апоптоза, вызванного цисплатином. И, как следует из нашего эксперимента по РНК интерференции (**Рис. 43Г**), такой эффект, вероятно, связан с тем, что мономер белка Survivin лучше, чем Survivin^{WT}, ингибирует белок Smac/DIABLO. В данном эксперименте мы трансфецировали клеточные линии, экспрессирующие различные мутанты белка Survivin, миРНК к люциферазе (siLUC) в качестве контроля или миРНК к Smac/DIABLO (siSmac). Из наших результатов следует, что уменьшение экспрессии Smac/DIABLO ведёт к исчезновению разницы между антиапоптозной активностью Survivin^{WT} и Survivina^{F101A/L102A}. Такой результат говорит в пользу того, что разница в действии мономерной и димерной форм белка Survivin обусловлена, по крайней мере, частично, с их влиянием на белок Smac/DIABLO.

Далее мы исследовали участие мономера белка Survivin в ингибировании апоптоза по средствам увеличения стабильности антиапоптозного белка XIAP. Методами коиммунопреципитации *in vitro* (**Рис. 44А**) и регистрации FRET с техникой фотообесцвечивания акцептора *in vivo* (**Рис. 44Б**) мы показали, что XIAP взаимодействует не только с Survivin^{WT}, как предполагалось ранее, но и с его мутантом, не способным к образованию димеров. Необходимо отметить, что наши эксперименты *in vivo* выявили взаимодействие XIAP только с Survivin^{F101A/L102A}, но не Survivin^{WT}. Этот результат свидетельствует в пользу того, что в клетке именно мономерная форма белка Survivin защищает XIAP от убиквитинилирования и последующей деградации.

Следующим шагом мы определили влияние мономера Survivin на каспазезависимый апоптоз раковых клеток. С этой целью параллельно с индуктором апоптоза (цисплатином или стауроспорином) к клеткам добавлялся zVAD(OMe)fmk – ингибитор широкого спектра каспаз, который, как было показано ранее [40], полностью блокирует каспаззависимый апоптоз. Из **рисунка 44В** видно, что в независимости от индуктора апоптоза Survivin^{F101A/L102A} более эффективно, чем Survivin^{WT} ингибирует каспазезависимый путь клеточной гибели.

В заключение мы сравнили эффект различных форм белка Survivin на микротрубочки. Для этого в клеточных линиях, экспрессирующих различные варианты этого белка было определено количество ацетилированного α -тубулина, который является одним из главных маркёров стабильных микротрубочек [137]. Как видно из **рисунка 44Г**, только Survivin^{WT} показывает способность стабилизировать микротрубочки, тогда как в клетках, экспрессирующих мутантные формы этого белка, количество ацетилированного α -тубулина близко к контрольному образцу (CFP). Этот результат был подтверждён с помощью метода фракционирования микротрубочек с последующим анализом содержания полимеризованного α -тубулина.

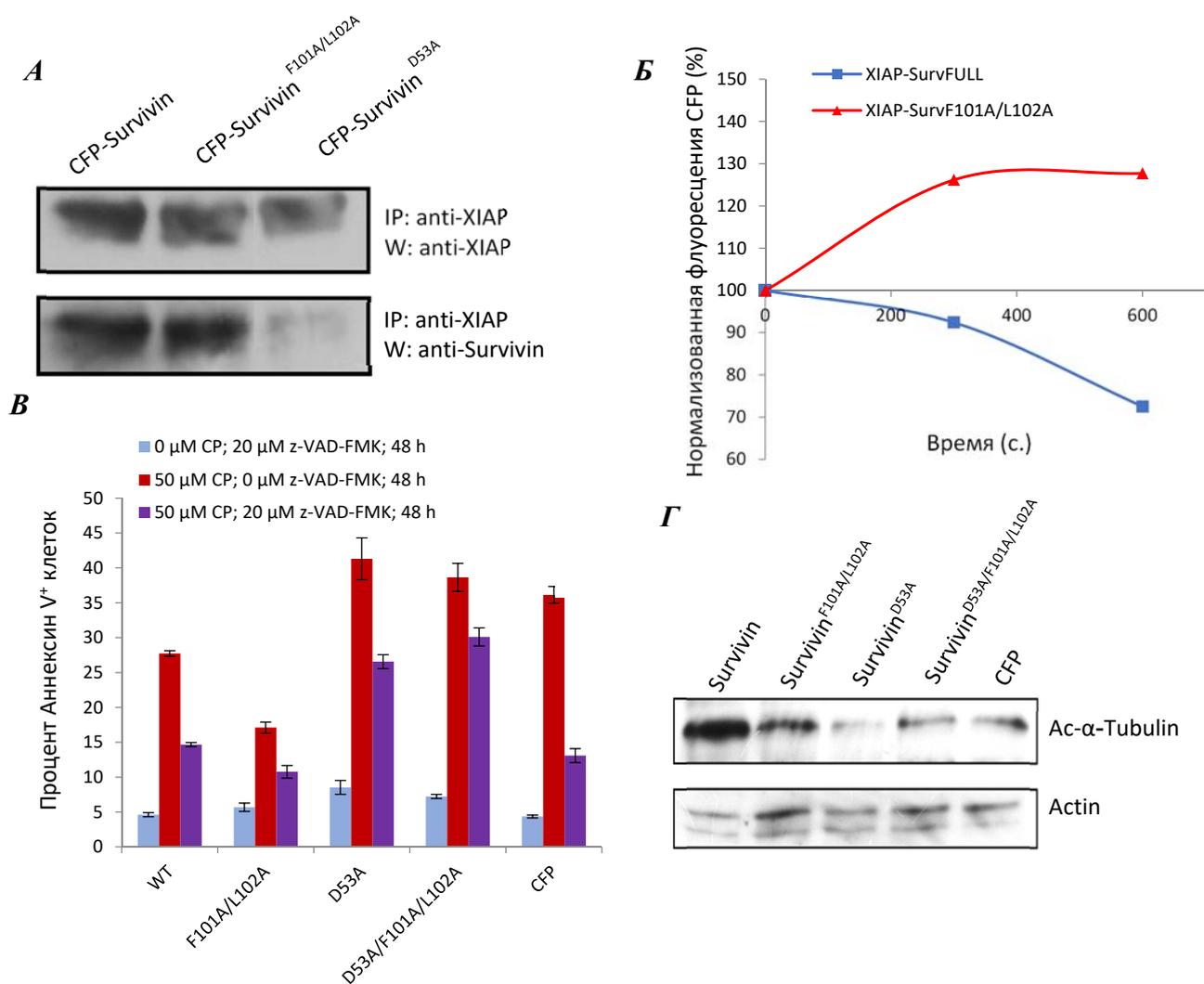


Рисунок 44. А - Иммунодетекция мутантов белка *Survivin*, коиммунопреципитирующихся с белком *XIAP*. Б - Графики зависимости интенсивности флуоресценции *CFP* от времени фотообесцвечивания *YFP* в клетках, коэкспрессирующих *YFP-Survivin* или *YFP-Survivin^{F101A/L102A}* и *CFP-XIAP*. В - Экспонирование фосфатидилсерина на наружную поверхность плазматической мембраны клеток, экспрессирующих различные мутанты белка *Survivin* после их обработки цисплатином в отсутствие или в присутствии *zVAD(OMe)fmk*. Г - Иммунодетекция ацетилированного α -тубулина, в клетках, экспрессирующих различные мутанты белка *Survivin*.

Суммируя всё вышесказанное, можно утверждать, что неспособный к димеризации *Survivin^{F101A/L102A}* обладает более высокой антиапоптозной активностью, чем *Survivin^{WT}*, который существует как в виде димера, так и в виде мономера. Таким образом, на основании наших результатов, можно предположить, что в защите клетки от апоптоза участвует именно мономерная форма белка *Survivin*. Эта гипотеза хорошо согласуется с ранее опубликованными результатами о том, что неацетилированный и в основном существующий в виде мономера цитоплазматический *Survivin* защищает раковые клетки от активации каспаз, в то время как более

подверженный димеризации ацетилированный Survivin в ядре играет роль проапоптозного белка, понижая транскрипцию важнейших генов ингибиторов апоптоза таких как BCL_{XL} и MLC1.

Предложенная нами модель антиапоптозного действия белка Survivin также даёт возможность объяснить, почему этот белок способен выполнять разные, и даже часто противоположные, функции в одних и тех же клеточных процессах. Так, например, можно предположить, что при делении часть молекул белка Survivin, находится в виде мономера в составе CPC и участвует в дестабилизации неправильно прикреплённых к кинетохорам микротрубочек, а димерная фракция белка Survivin взаимодействует с микротрубочками веретена деления и, напротив, повышает их стабильность. Эта гипотеза кажется нам крайне вероятной, так как доказано, что в состав комплекса белков-пассажиров хромосом входит именно мономер белка Survivin, и в данной работе мы впервые продемонстрировали, что именно димер белка Survivin стабилизирует микротрубочки в интерфазе, и, скорее всего, только он может напрямую взаимодействовать с полимеризованным тубулином, выполняя роль адаптора между микротрубочками и стабилизирующими их белками. Если предположить, что часть своих функций Survivin выполняет в виде димера, а часть в виде мономера, то регуляция равновесия димер - мономер может служить «переключателем» между различными функциями этого белка.

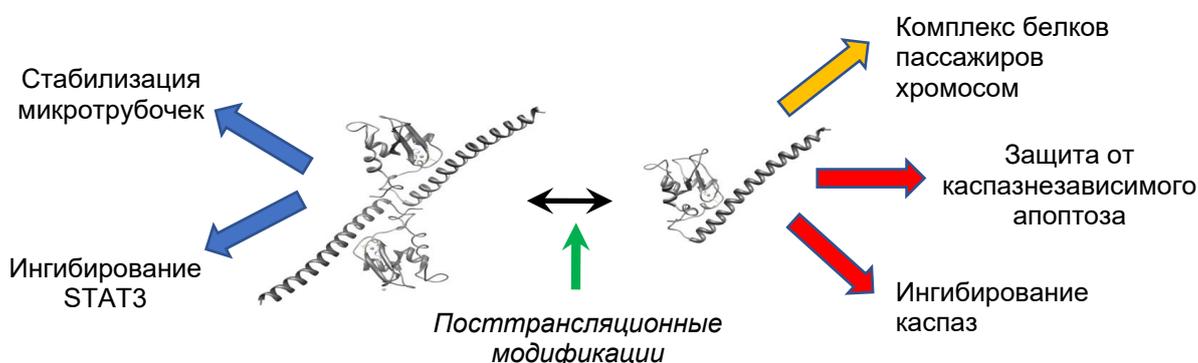


Рисунок 45. Предполагаемая модель функционирования белка *Survivin*. В клетке димерная и мономерная формы белка *Survivin* находятся в состоянии динамического равновесия, которое сдвигается в ту или иную сторону с помощью посттрансляционных модификаций этого белка.

Всё вышеперечисленное свидетельствует о том, что, во-первых, участок димеризации играет ключевую роль в регуляции функциональной активности белка *Survivin* в опухолевых клетках и, во-вторых, что именно мономер этого белка (т.е. *Survivin* с открытым участком димеризации) выполняет наиболее важные для раковых клеток функции - защищает их от запрограммированной клеточной гибели. Эти результаты позволили нам предположить новую модель функционирования белка *Survivin* в человеческих клетках (**Рис. 45**) [138, 139].

4.1.3. Изучение ингибитора активных форм кислорода Параоксоназы 2.

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

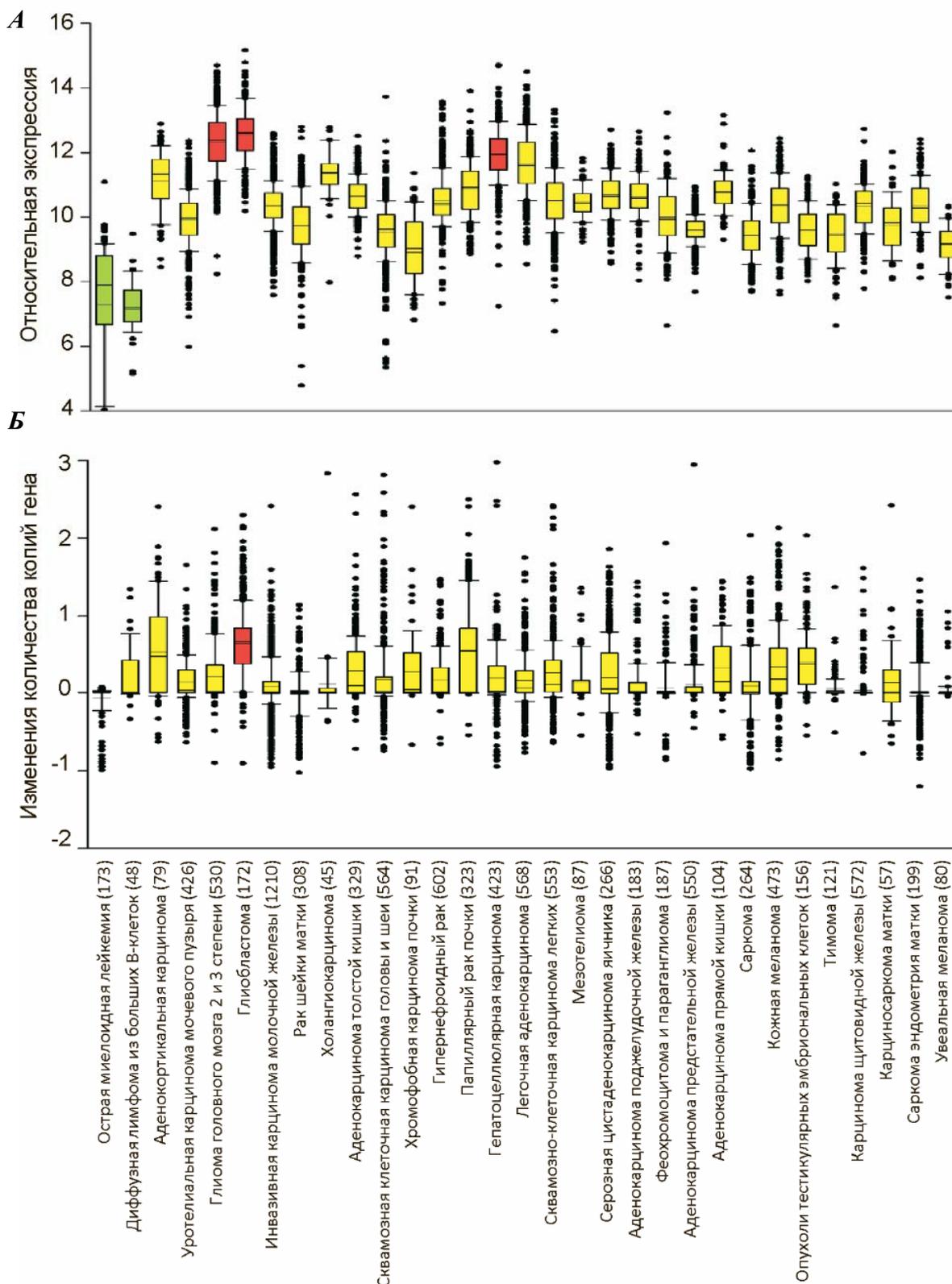


Рисунок 46. Относительный уровень экспрессии (А) и изменение числа копий (Б) гена *PON2* в опухолях от пациентов с различными видами рака. Результаты получены с помощью биоинформатического анализа базы данных TCGA. В скобках указано число пациентов для каждого из видов опухолей.

Для того чтобы определить в каких видах злокачественных опухолей *PON2* может играть потенциально важную онкогенную роль мы сравнили экспрессию этого белка, используя результаты РНК секвенирования из базы данных TCGA (The Cancer Genome Atlas). Проанализировав данные, полученные от более чем 10 000 пациентов с 31 видом раковых опухолей мы обнаружили, что наибольший уровень экспрессии *PON2* наблюдается при раке печени и раке головного мозга (1-3 стадии глиомы и 4 стадия глиобластома), а самый низкий уровень этого белка характерен для рака крови (миелоидной лейкемии и В-клеточной лимфомы) (**Рис. 46А**). Чтобы понять вызваны ли наблюдаемые нарушения экспрессии *PON2* мутациями в соответствующем гене мы проанализировали данные секвенирования геномной ДНК с целью выявить возможные амплификации или делеции этого гена в различных типах опухолей. Как видно из **рисунка 46Б**, для глиобластома характерна амплификации гена *PON2*, а для лейкемии, напротив, делеция этого гена. Такой результат хорошо согласуется с нашими данными по анализу экспрессии *PON2*.

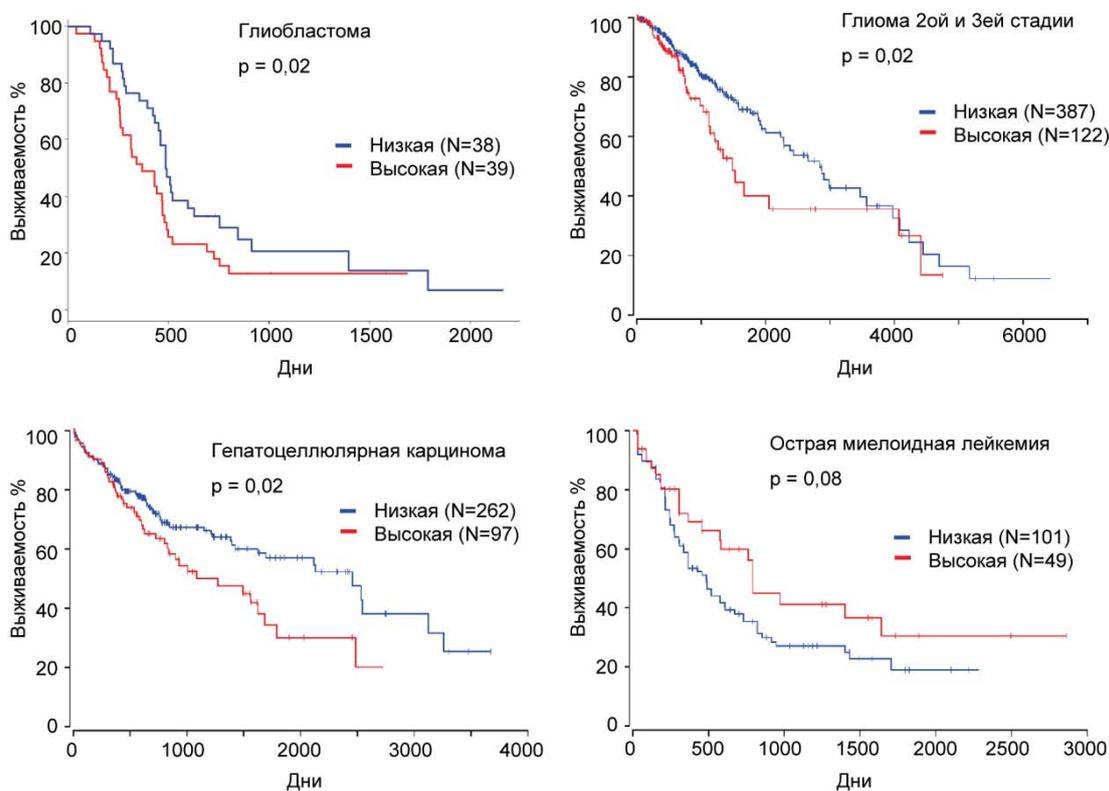


Рисунок 47. Кривые Каплан-Майера, показывающие выживаемость пациентов с глиобластомой, 2ой и 3ей стадиями глиомы, гепатоцеллюлярной карциномой и острой миелоидной лейкемией. Пациенты были разделены на 2 группы на основании экспрессии PON2. Результаты получены с помощью биоинформатического анализа базы данных TCGA. На графиках указано количество пациентов в каждой из групп, а также значения p.

Чтобы оценить влияние PON2 на пролиферацию и устойчивость к терапии опухолевых клеток, мы проанализировали, как уровень экспрессии этого белка связан с выживаемостью пациентов с различными видами рака. Данные на **рисунке 47** убедительно показывают, что для рака печени, глиомы и глиобластомы высокий уровень PON2 коррелирует с плохим прогнозом для выживаемости пациентов, в то время как для лейкемии наблюдается противоположная картина – повышенное количество параоксонназы 2 наоборот является хорошим прогностическим фактором. Такие результаты полностью согласуются с нашими данными о уровне экспрессии и мутациях в гене PON2.

Отличительной клинической особенностью рака головного мозга является большая некротическая зона, возникающая в центре опухоли, её объём зачастую может во много раз превышать количество живой опухолевой ткани [140]. Такой высокий уровень гибели раковых клеток связан с недостаточным кровоснабжением глиобластом и крайне ограниченным пространством для роста. По этой причине клетки глиобластомы постоянно находятся в условиях стресса, вызванного нехваткой питательных веществ и токсичными компонентами, выделяемыми соседними погибающими клетками. Аналогичная ситуация наблюдается в печени, так как именно в этот орган поступают потенциально опасные соединения из крови. Таким образом, можно предположить, что PON2 имеет крайне важное значение для клеток рака печени и мозга, так как помогает им приспособиться к существованию в среде с высокой концентрацией токсичных продуктов метаболизма и недостатком питательных веществ. Поэтому при развитии данных опухолей может происходить отбор клеток с повышенной экспрессией PON2, в том числе и благодаря амплификации соответствующего гена. Напротив, клетки рака крови существуют в благоприятной среде, богатой кислородом, питательными веществами и, не содержащей потенциально токсичных соединений. В следствие этого, они не нуждаются в высоком уровне экспрессии PON2, и, по-видимому, наоборот пониженное содержание PON2 способствует более агрессивному фенотипу таких опухолевых клеток.

Чтобы получить больше информации о функциях PON2 в опухолевых клетках, мы окрасили 6 клеточных линий (U87-MG - глиобластома; MRC5-V2 – эмбриональное лёгкое; SKOV3 – карцинома яичников; A549 – карцинома лёгкого; HepG2 – карцинома печени; HT1080

- фибросаркома) антителами на этот белок. Наши результаты показали, что наибольшая интенсивность окраски наблюдается в клетках глиобластомы и карциномы печени, что согласуется с данными биоинформатического анализа (**Рис. 48А**). Во всех исследованных типах клеток PON2 локализовалась в области вокруг ядра. Поскольку качество иммуноцитофлуоресцентного окрашивания не позволяло точно определить локализацию PON2 в клетках, следующим шагом мы изучили локализацию экзогенно экспрессированной параоксоназы 2. Для этого мы котрансфецировали клетки линии U87-MG плазмидами pTagRFP-C-PON2 (кодирует красный флуоресцентный белок, присоединённый к N концу PON2) и pTurboGFP-N-PON2 (кодирует зелёный флуоресцентный белок, присоединённый к С концу PON2), а также окрасили трансфецированные клетки антителами на PON2. Как видно из **рисунка 48Б**, в независимости от того, с какой стороны PON2 был расположен флуоресцентный белок PON2 преимущественно локализовалась вокруг ядра.

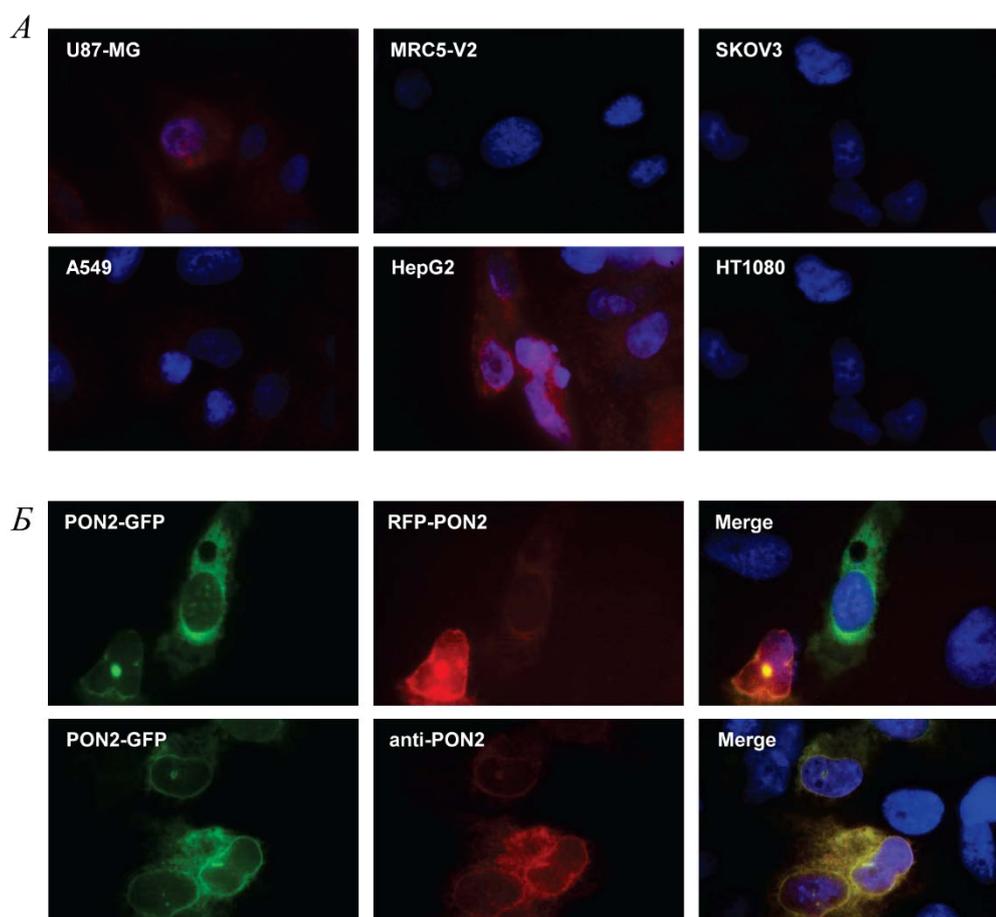


Рисунок 48. А – Иммунофлуоресцентное окрашивание различных клеточных линий антителами на PON2. Б - Флуоресцентная микрофотография клеток, котрансфецированных плазмидами pTagRFP-C-PON2 и pTurboGFP-N-PON2 (верхняя панель) или клеток трансфецированных плазмидой pTurboGFP-N-PON2 и затем окрашенных антителами на PON2 (нижняя панель).

Чтобы точно определить локализацию PON2, мы окрасили трансфицированные клетки антителами на CRM1- маркер ядерной мембраны [141]. Как видно из **рисунка 49А**, PON2 вокруг ядра полностью колокализуется с CRM1, что говорит о том, что существенная фракция PON2 в клетке расположена на ядерной мембране.

Далее мы попытались определить аминокислотную последовательность PON2, необходимую для локализации этого белка на ядерной мембране. Для этого мы создали плазмиды, кодирующие 3 фрагмента PON2 (1-27 а.к.; 1-83 а.к.; 1-168 а.к.), несущие на своём N-конце зелёный флуоресцентный белок. Как видно из **рисунка 49Б**, первых 27ми аминокислот PON2, кодирующих трансмембранный сегмент этого белка, уже достаточно для локализации PON2 на ядерной мембране.

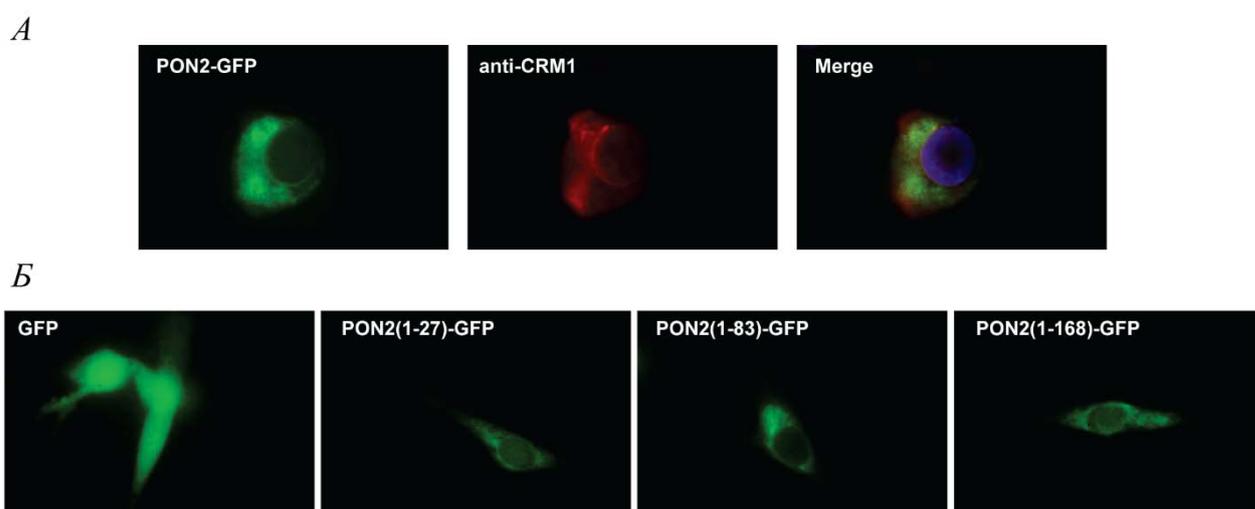


Рисунок 49. А – Флуоресцентная микрофотография клеток, трансфицированных плазмидой *pTurboGFP-N-PON2* и затем окрашенных антителами на CRM1. Б - Флуоресцентная микрофотография клеток, трансфицированных плазмидами, кодирующими различные участки PON2 (1-27 а.к.; 1-83 а.к.; 1-168 а.к.) или GFP в качестве контроля.

В заключение мы использовали метод LC-MS/MS для определения внутриклеточных белков, взаимодействующих с PON2. Для этого мы трансфицировали клетки плазмидой, кодирующей PON2 или контрольный белок с последовательностью Halo-tag на С-конце, и, используя магнитные частицы, выделили экзогенный PON2 и взаимодействующие с ним белки. Последующий LC-MS/MS анализ позволил определить 286 белков, копреципитирующих с PON2. Из этих белков 168 были также обнаружены и в контрольном образце, а 119 взаимодействовали исключительно с PON2, но не с контрольным белком (**Таблица 3**). Среди белков, уникально взаимодействующих с PON2, оказалось 6 белков, локализованных на ядерной мембране (CACYBP, TMPO, S100A6, RAN, UBXN4, TOR1AIP1). Важно отметить, что для белка CACYBP

было идентифицировано наибольшее (за исключением PON2) количество пептидов, что может говорить о высокой интенсивности взаимодействия CACYBP и PON2.

Таблица 3. Список белков, копреципитирующихся с PON2. Указано название гена (Ген), молекулярная масса белка в кДа (MW) и количество уникальных пептидов, идентифицированных для данного белка с помощью LC-MS/MS масс-спектрометрии (N).

Ген	MW	N	Ген	MW	N	Ген	MW	N	Ген	MW	N
PON2	39	9	RPS20	13	2	RPS18	18	1	SNU13	14	1
CACYBP	26	7	RPS7	22	2	RPL12	18	1	HNRNPD	31	1
RPS10	19	6	RPL11	20	2	RPL14	23	1	FKBP3	25	1
RPS19	16	6	RPL30	13	2	ADD3	74	1	PTRF	43	1
HSPA1A	70	6	NARS	63	2	AIDA	35	1	DHX15	91	1
PARP1	113	6	DTD1	23	2	CTNBL1	65	1	PSME3	30	1
RPS5	23	5	EIF2S2	38	2	FLJ51636	12	1	DEK	43	1
EIF3A	75	5	EIF3G	36	2	CCDC124	26	1	DR1	19	1
EIF5	49	5	EXOSC2	33	2	COL12A1	333	1	S100A11	12	1
MANF	21	5	FARSLA	58	2	CSTB	11	1	S100A6	10	1
NELFE	43	5	GTF2F2	28	2	DCD	11	1	SEC61G	8	1
AHNAK	629	5	HDGF	27	2	MCM4	97	1	PTD004	20	1
FLJ20643	32	5	CDC37	44	2	DNAJC17	35	1	SARNP	24	1
ERP29	29	4	HYPK	15	2	DNAH10	515	1	SRSF1	28	1
EIF3J	29	4	IMPDH2	56	2	EEF1B2	25	1	SRSF3	19	1
EIF4B	69	4	TIMM8B	9	2	GTF2F1	58	1	STK10	112	1
FEN1	43	4	PYM1	23	2	GAPDHS	45	1	STK24	23	1
METAP1	43	4	CWC27	54	2	RAN	24	1	SARS	59	1
RPL9	22	3	PABPC1	71	2	HNRNPUL1	96	1	SNRPF	10	1
ATP5O	23	3	PTBP1	57	2	HIST1H2AB	14	1	CWC15	27	1
DNAJB1	38	3	PAWR	37	2	HIST1H4A	11	1	STMN1	17	1
HNRNPA1	39	3	PDIA3	57	2	IGF2BP1	63	1	TOR1AIP1	66	1
KRT2	65	3	MAGOHB	17	2	ITIH3	100	1	TCEAL4	25	1
TMPO	75	3	PBDC1	26	2	LIMS1	38	1	TUBA1C	50	1
TIMM8A	11	3	SNRPB	25	2	ZFYVE28	96	1	PTPN1	50	1
PA2G4	45	3	TARS	83	2	MESDC2	26	1	YARS	59	1
FAM50A	40	3	NSUN2	86	2	METAP2	53	1	UBXN1	33	1
SKIV2L2	118	3	MRPS11	21	1	MAPRE1	30	1	UBXN4	57	1
TCEA1	34	3	RPS16	16	1	DNAJC19	12	1	HDLBP	141	1
RPS15	17	2	RPS17	16	1	NAA50	19	1			

Основываясь на полученных нами данных, можно предположить, что в опухолевых клетках PON2 защищает внутриклеточные мембраны от окисления, а также, возможно, не позволяет свободным радикалам проникнуть сквозь ядерную мембрану и повредить генетический материал клеток. Таким образом, PON2 способствует выживаемости солидных опухолей, развивающихся в неблагоприятных условиях [142, 143].

4.1.4. Изучение Трансглутаминазы 2 - ингибитора активированной формы каспазы-3.

Выше было описано три белка, каждый из которых способен тем или иным образом ингибировать процесс запрограммированной клеточной гибели. Если ни один из них не помог клетке предотвратить начало апоптоза, то финалом этого процесса является активация эффекторных каспаз, в первую очередь каспазы-3, которые разрушают клеточные белки. Долгое время считалось, что активация каспазы-3 для клетки является точкой невозврата, после прохождения которой любая клетка обречена на смерть. На этом фоне удивительно выглядела работа Ямагучи и Ванга, в которой авторы утверждали, что опухолевые клетки способны эффективно ингибировать активную каспазу-3, благодаря повышенной экспрессии уникального кросс-сшивающего фермента - Трансглутаминазы 2 (TGM2) [87]. Эти данные вызвали большое количество споров, так как TGM2 работает во внеклеточной среде в присутствии ионов Ca^{2+} , однако в цитоплазме клетки даже максимально возможная концентрация Ca^{2+} на порядок ниже той, что необходима для появления кросс-сшивающей активности у этого фермента *in vitro* [144].

Чтобы разрешить это противоречие мы впервые разработали метод, позволяющий следить за активацией TGM2 в живой клетке. Из результатов рентгеноструктурного анализа активной и неактивной форм TGM2 видно, что при активации кросс-сшивающей функции этого фермента происходит драматическое изменение его конформации, в результате которого расстояние между N- и C- концами TGM2 увеличивается с 16Å до 140Å (**Рис. 50А**) [145]. Опираясь на эти данные, мы создали плазмиду, кодирующую TGM2 с YFP и CFP на N- и C- концах соответственно. Мы предположили, что когда TGM2 находится в неактивной «закрытой» конформации, CFP и YFP будут достаточно сближены для безизлучательного переноса энергии с CFP на YFP (FRET). После перехода TGM2 в активную «открытую» конформацию дистанция между флуоресцентными белками окажется более 100Å, и на таком расстоянии FRET станет невозможен [146]. Для того чтобы проверить это предположение, мы трансфицировали клетки линии A549 плазмидой, кодирующей YFP-TGM2-CFP, после чего добавили в культуральную среду Ca^{2+} ионофор A23187, который повышает концентрацию Ca^{2+} в цитоплазме и вызывает активацию TGM2 [147]. С помощью метода фотообесцвечивания акцептора мы показали, что при обработке клеток A23187 происходит резкое уменьшение эффективности FRET (**Рис. 50Б**). Более точный количественный расчёт нормализованного сигнала FRET (N_{FRET}) подтвердил эти данные (**Рис. 50В**). В заключении мы использовали стандартный метод оценки активности TGM2, основанный на определении уровня биотин-кадаверина (BPA), встроенного в клеточные белки [148]. Из **рисунка 50Г** видно, что обработка клеток ионофором A23187 существенно увеличивает количество детектируемого BPA. Таким образом, можно утверждать, что результаты разработанного нами метода согласуются с данными, полученными с помощью стандартной

методики [96]. Однако важно отметить, что использование ВРА позволяет, во-первых, исследовать только фиксированные клетки, и, во-вторых, обладает низкой специфичностью, так как многие ферменты помимо TGM2 способны взаимодействовать с ВРА. Созданный нами метод детекции активности TGM2 лишён этих недостатков.

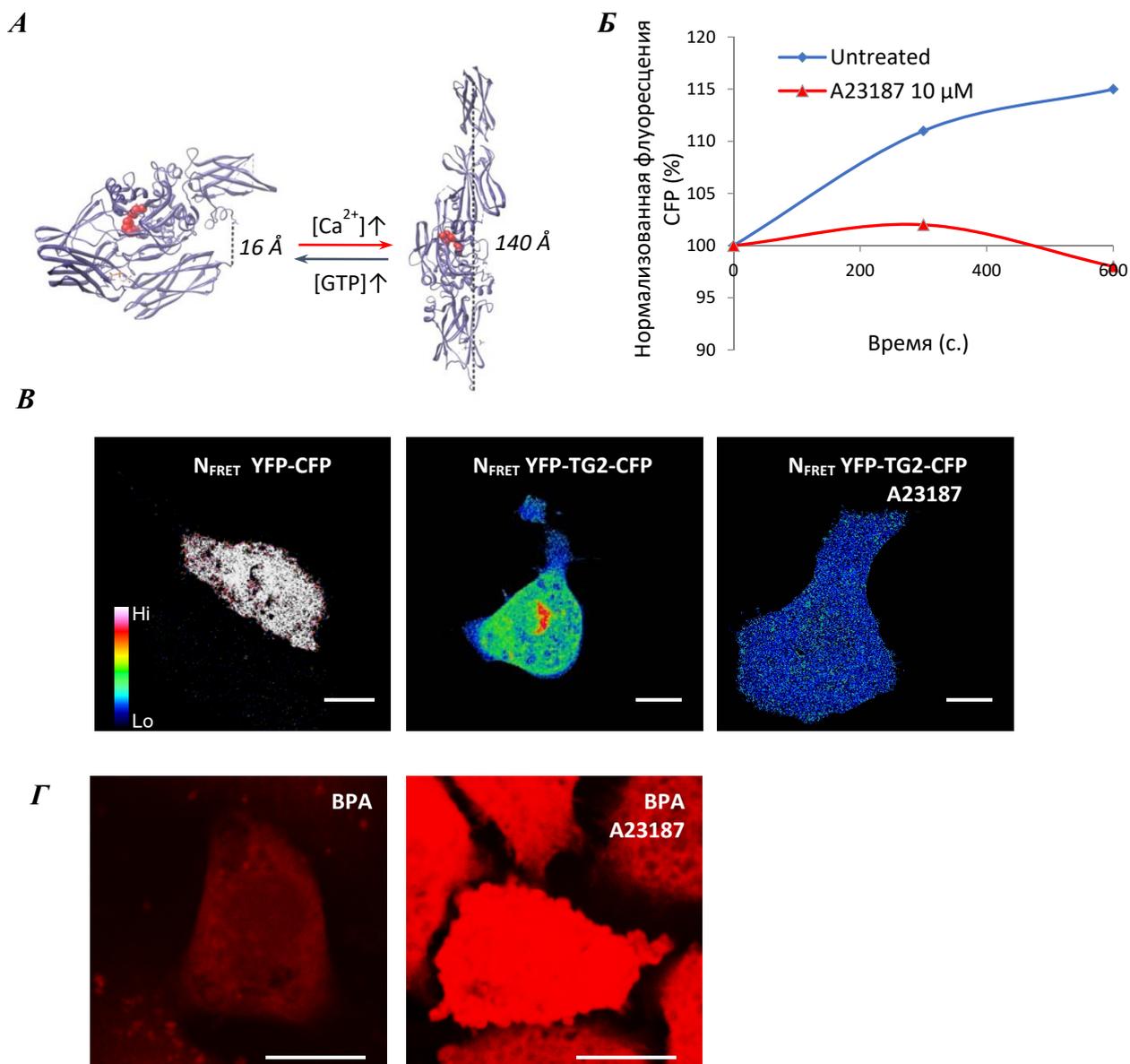


Рисунок 50. А – Схематическое изображение конформационных изменений белка TGM2. Б - Графики зависимости интенсивности флуоресценции CFP от времени фотообесцвечивания YFP в клетках, экспрессирующих YFP-TGM2-CFP и обработанных Ca^{2+} ионофором A23187. В – Интенсивность N_{FRET} в клетках, экспрессирующих YFP-CFP (положительный контроль) или YFP-TGM2-CFP и обработанных A23187. Г – Детекция биотин-кадаверина после инкубации клеток с ВРА в течение полутора часов в присутствии или отсутствии 10 мкМ A23187.

Получив подтверждение того, что наш метод позволяет правильно следить за активацией TGM2, мы исследовали изменение конформации этого фермента при индукции апоптоза. Как видно из **рисунка 51**, вскоре после добавления стауроспорина в трансфицированных клетках происходит уменьшение N_{FRET} до той же величины, что и в клетках, обработанных A23187. Такой результат свидетельствует о том, что уже на ранних стадиях апоптоза происходит изменение конформации и активация TGM2, что, в свою очередь, может являться дополнительным механизмом защиты опухолевых клеток от запрограммированной клеточной гибели.

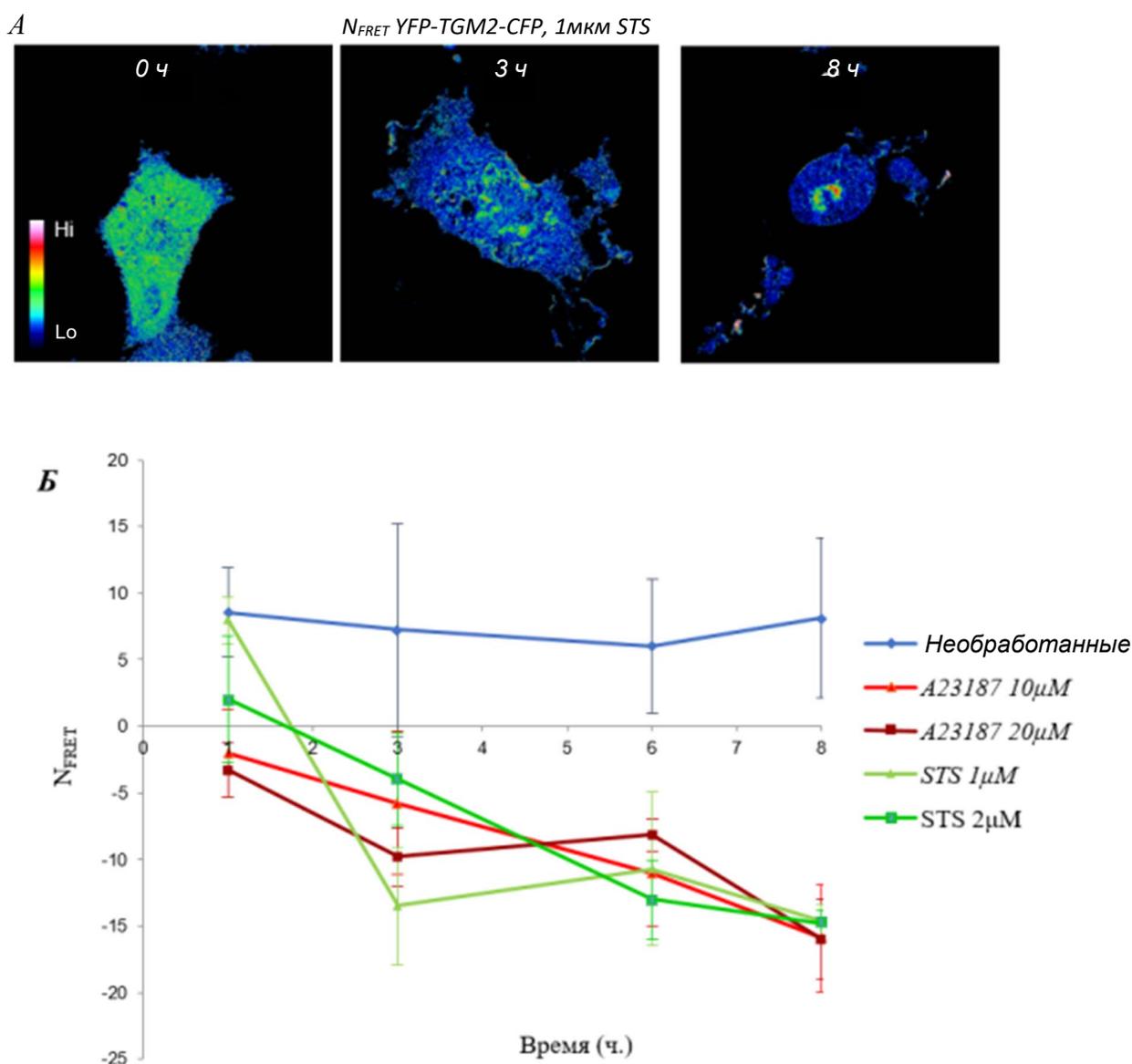


Рисунок 51. *А* – Интенсивность N_{FRET} в клетках, экспрессирующих YFP-TGM2-CFP и обработанных стауроспоринном (STS). *Б* – График зависимости N_{FRET} от времени инкубации клеток с различными концентрациями STS и A23187.

Следующим шагом мы решили определить конформацию TGM2 в различных компартментах клетки. Как видно из **рисунков 50В, 51А и 52А**, значение N_{FRET} существенно ниже у поверхности плазматической мембраны. Данный результат свидетельствует в пользу того, что в нормальных условиях именно в этом компартменте клетки наибольшее количество TGM2 имеет активную конформацию. Наши результаты хорошо согласуются с предположенной ранее гипотезой о том, что TGM2, ассоциированная с мембраной, может быть активна даже в нормальных условиях благодаря локально повышенной концентрации Ca^{2+} , а также вследствие взаимодействия с фосфолипидными молекулами [144].

Интересно отметить, что примерно в трети трансфицированных клеток наблюдается накопление TGM2 в перенуклеарной области, и, судя по расчётам N_{FRET} , эта транглутаминаза находится в закрытой конформации (**Рис. 50В, 51А и 52А**). Более того, даже после обработки клеток стауроспорином, TGM2 вокруг ядра сохраняет неактивную конформацию, в то время как TGM2 в цитоплазме быстро активируется. Мы подтвердили этот результат с помощью детекции экзогенного биотин-кадаверина, встроившегося в клеточные белки. Как видно из **рисунка 52Б**, в перенуклеарной области не наблюдается избыточного накопления биотин-кадаверина, несмотря на то, что здесь присутствует наибольшее количество белка TGM2.

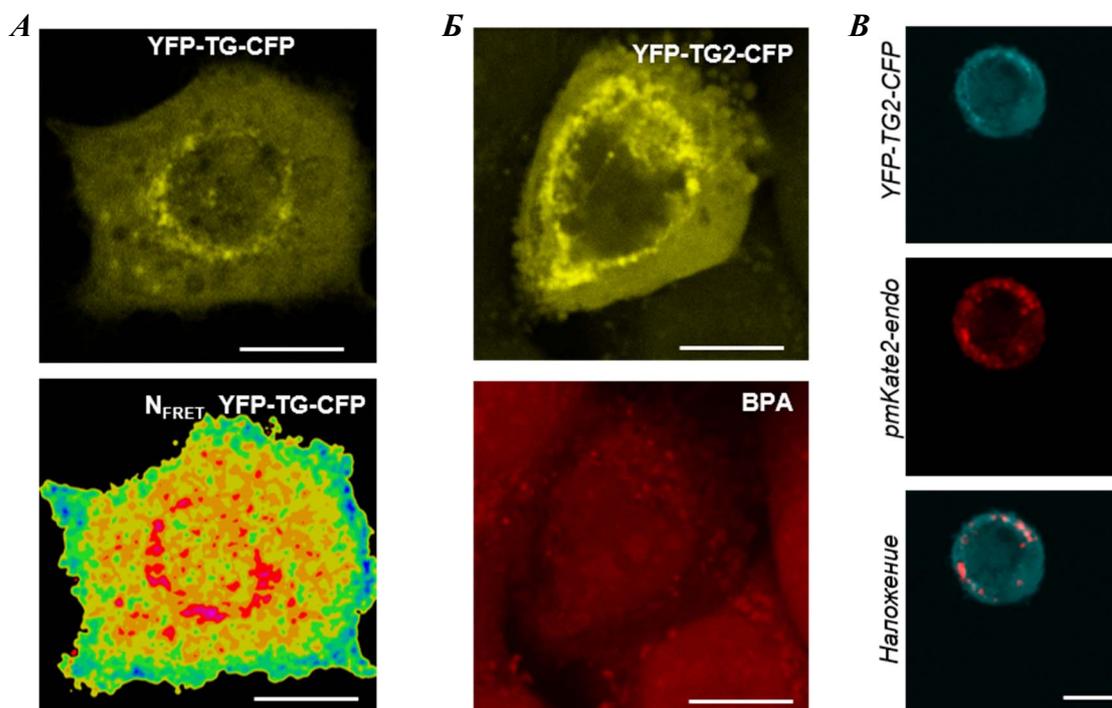


Рисунок 52. А – Флуоресценция YFP (сверху; отражает количество TGM2) и интенсивность N_{FRET} (снизу; отражает конформацию TGM2) в различных компартментах клетки, экспрессирующей белок YFP-TGM2-CFP. Б – Детекция флуоресценция YFP (сверху) и инкорпорирование BPA (снизу) в клетке, экспрессирующей белок YFP-TGM2-CFP. В – колокализация белка YFP-TGM2-CFP (синий) и маркёра pmKate2-endo (красный).

Получив эти данные, мы решили определить какой внутриклеточной структуре соответствует локализуемая в перенуклеарной области TGM2. Для этой цели одновременно с трансфекцией клеток плазмидой pEYFP-TG2-CFP, мы использовали флуоресцентные красители для визуализации различных внутриклеточных органелл (лизосомы - LysoTracker, митохондрии - MitoTracker, аппарат Гольджи - NBD C6-ceramid и эндосомы - pmKate2-endo). Как видно из **рисунка 52В** скопление неактивной TGM2 в перенуклеарной области соответствует эндосомам.

Этот результат показался нам крайне интересным, так как условия в эндосомах должны наоборот благоприятствовать активации TGM2 (высокая концентрация Ca^{2+} и низкая концентрация GTP). Можно предположить, что TGM2 в перенуклеарных эндосомах находится в комплексе с неким белком, препятствующим активации кросс-сшивающей функции этого фермента. Такое ингибирование может защищать белки, предназначенные на экспорт из клетки, от образования ненужных кросс-сшивок. Возможно, функция TGM2 в эндосомах связана с дисульфидизомеразной активностью этого фермента [97]. Так TGM2 может обеспечивать правильный фолдинг белков, экспортирующихся во внеклеточное пространство. Это предположение хорошо согласуется с данными о том, что TGM2 необходима для правильной сборки комплекса гистосовместимости I типа [144].

Таким образом, в данной части работы нами был создан и проверен новый метод, позволяющий следить за изменением конформации TGM2 в живой клетке в режиме реального времени. С помощью этого метода нами было показано, что на самых ранних стадиях апоптоза в клетке происходит изменение конформации и активация TGM2. Кроме того, мы впервые исследовали конформацию TGM2, находящейся в различных компартментах клетки. Нами было показано, что у поверхности наружной клеточной мембраны TGM2 находится в «открытой» конформации, в то время как в перенуклеарных эндосомах этот фермент имеет «закрытую» конформацию [149].

4.2. Исследование роли апоптоза в эволюции злокачественных опухолей.

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

4.2.1. Изучение межклеточных сигналов, продуцируемых клетками рака яичников после сеансов химиотерапии.

Для того чтобы исследовать сигналы, продуцируемые апоптотическими опухолевыми клетками, мы решили начать с изучения наиболее простого и удобного объекта – асцитических жидкостей [150]. Асцитическая жидкость (асцит) накапливается в брюшной полости пациентов с различными видами злокачественных новообразований, в первую очередь с раком яичника, а также при некоторых других не онкологических заболеваниях. Асциты представляют собой естественную среду обитания опухолевых клеток, которая частично отделена от других биологических жидкостей организма. Таким образом, в асците происходит накопление и концентрирование разнообразных молекул, выделяемых раковыми клетками и их микроокружением. Всё это делает асциты замечательным объектом для изучения секретомов опухолевых клеток. Однако, проблемой при анализе асцитов является высокий разброс концентраций белков, превышающий 10 порядков [151]. Такой широкий диапазон концентраций сильно затрудняет детекцию низко представленных белков. Чтобы решить эту проблему, нами был разработан новый метод фракционирования асцитов, который позволил детектировать более 2000 белков в образце. Этот результат в несколько превосходит любые данные, опубликованные ранее для асцитических жидкостей (229 [152], 445 [152] и 484 белков [153]).

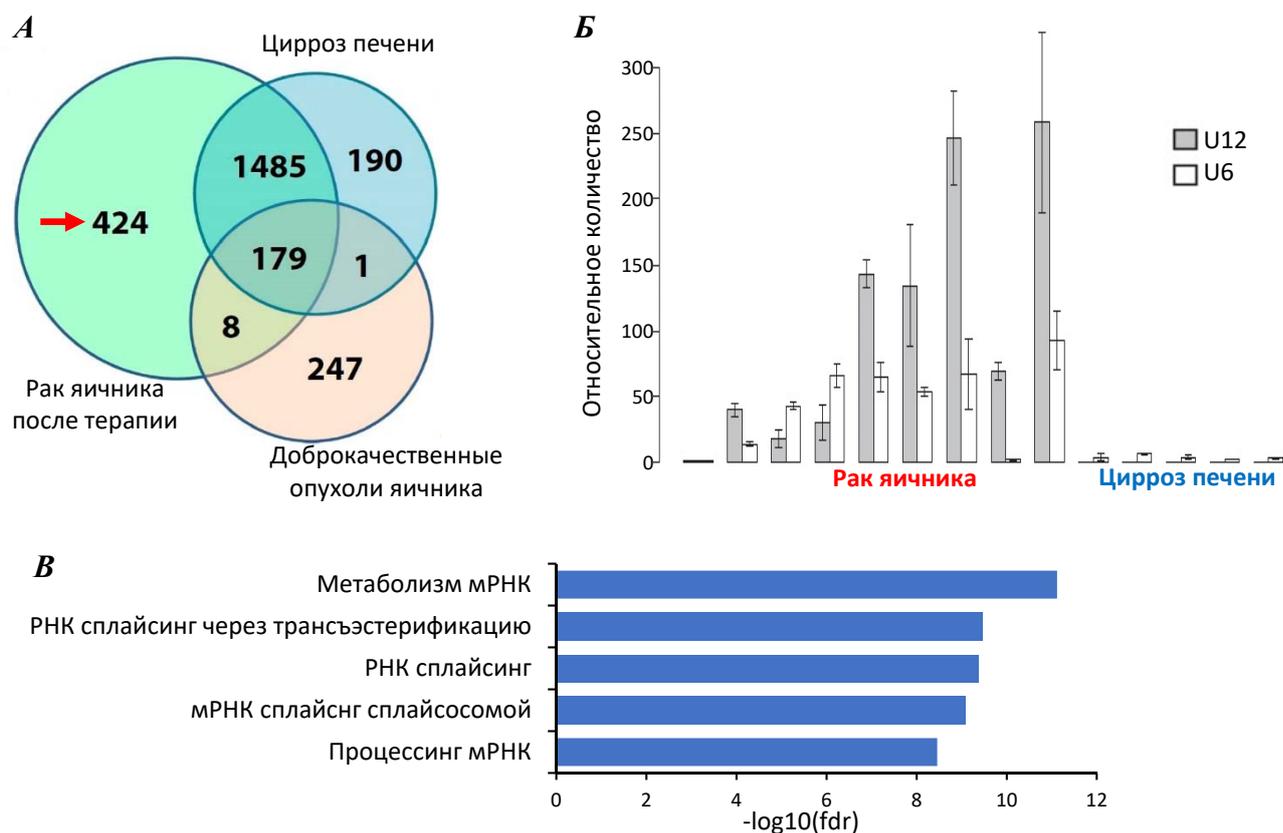


Рисунок 53. А – Количество белков, идентифицированных в асцитах, полученных от пациентов с циррозом печени (жёлтый), доброкачественными опухолями яичников (красный) и раком яичников после терапии (синий). Б – Анализ обогащения белков специфичных для асцитических жидкостей пациентов с раком яичников после терапии. В – Относительное количество U6 и U12 РНК сплайсосомы в асцитах, полученных от пациентов с циррозом печени и раком яичников после терапии.

Мы использовали созданный нами метод фракционирования и последующую LC-MS/MS масс-спектрометрию для определения белков в образцах асцитических жидкостей, полученных от пациентов с раком яичников после сеанса химиотерапии. В качестве контроля нами были проанализированы асциты от пациентов с циррозом печени и с доброкачественными опухолями [154]. Такие образцы позволили нам исключить из рассмотрения компоненты плазмы крови, а также белки, неспецифически секретируемые нормальными тканями в ответ на накопление жидкости в брюшной полости. Таким образом, в ходе данного эксперимента нами было определено 424 белка, появляющихся после сеанса химиотерапии в асцитических жидкостях у пациентов с раком яичников (Рис. 53А). Биоинформатический анализ этих белков привёл к неожиданному результату. Оказалось, что среди них наиболее сильно представлены белки, относящиеся к сплайсингу пре-мРНК (Рис. 53Б). Хочется подчеркнуть, что асцит представляет собой внеклеточную среду, и наличие сплайсосомных белков во внеклеточной среде ни разу не

было описано ранее. В норме сплайсосомные белки существуют в виде макромолекулярного комплекса (сплайсосомы) с короткими некодирующими уридин богатыми РНК (U РНК) [155]. Поэтому, чтобы подтвердить, что асциты после терапии действительно обогащены компонентами сплайсосом, мы проверили наличие U РНК в асцитических жидкостях и показали, что их уровень многократно повышен в опухолевых образцах после терапии (**Рис. 53В**).

Развивая нашу гипотезу, мы предположили, что если раковые клетки действительно способны секретировать сплайсосомные белки во внеклеточную среду, то в плазме крови пациентов с опухолевыми заболеваниями должны появляться аутоантитела к этим белкам. Чтобы проверить такое предположение, мы выделили рекомбинантный белок сплайсосомы U2AF1 (**Рис. 54А**) и, иммобилизовав его на подложке, определили наличие антител к этому белку в плазме крови пациентов с раком яичника, остеосаркомой, раком прямой кишки, раком лёгкого и здоровых доноров. Как видно из **рисунка 54Б**, для всех вышеперечисленных видов опухолей характерно повышение титра аутоантител к белку U2AF1. Такой результат подтверждает идею об экспорте сплайсосом раковыми клетками и хорошо согласуется с данными, опубликованными ранее, по анализу репертуара аутоантител пациентов с онкологическими заболеваниями [156].

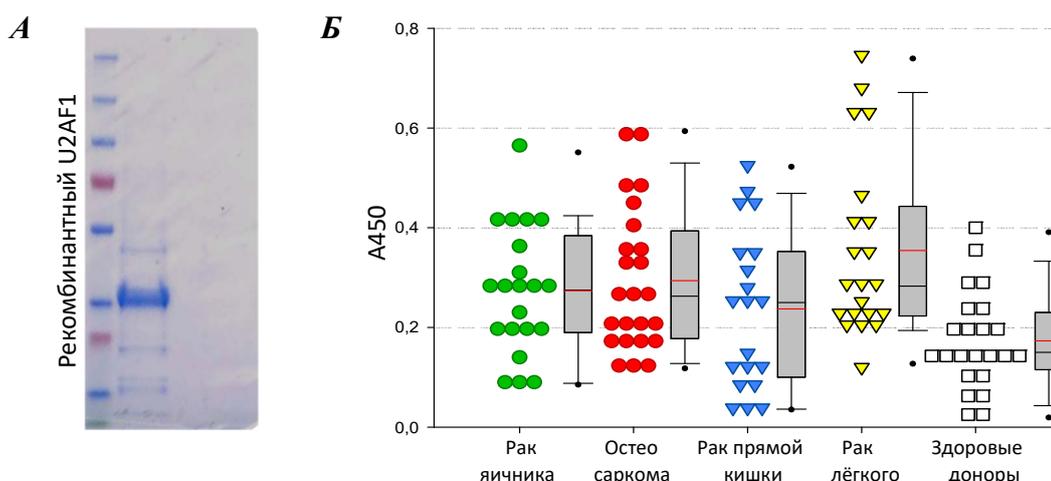


Рисунок 54. А – Электрофореграмма, демонстрирующая чистоту выделения рекомбинантного U2AF1. Б – Определения титра аутоантител к белку U2AF1 в плазме крови пациентов с различными видами рака и здоровых доноров методом твёрдофазного ИФА.

Известно, что химиотерапия вызывает не только апоптотическую, но и некротическую гибель клеток, более того, даже для не обработанных препаратами опухолей характерен гораздо более высокий уровень некроза и апоптоза по сравнению с нормальными тканями [157]. По этой причине следующая серия наших экспериментов была направлена на то, чтобы установить является ли экспорт сплайсосомных белков специфическим процессом или же сплайсосомы выходят во внеклеточную среду вследствие физического разрушения раковых клеток. Мы

предположили, что если причина появления сплайсосом в асцитах это «лопанье» клеток, то вместе с U РНК из клеток должны выходить и рибосомальные рРНК. Если же экспорт сплайсосом представляет собой специфический процесс, то во внеклеточное пространство будут выходить лишь сплайсосомные РНК, в то время как рРНК останутся в клетке. Данные на **рисунке 55А** показывают, что отношение U РНК к рРНК в асцитических жидкостях более чем в 10 000 раз превышает таковое внутри клеток рака яичника. Другими словами, экспорт U РНК из клеток в 10 000 раз более эффективен, чем экспорт рРНК. Такой результат говорит в пользу гипотезы о направленном экспорте сплайсосом из опухолевых клеток, подвергшихся терапии. Следующий ключевой вопрос заключался в том, в какой форме сплайсосомы присутствуют во внеклеточной среде. Используя антитела к разнообразным сплайсосомным белкам и их комбинациям, мы попытались удалить сплайсосомы из асцитов, но все эти попытки окончились неудачно (**Рис. 55Б**). Однако когда мы использовали антитела к белку CD63 - поверхностному маркеру экзосом (мембранных везикул размером 50-200 нм; [158]), то нам удалось более чем в 3 раза понизить содержание сплайсосом в асцитических жидкостях (**Рис. 55Б**). Такой результат убедительно показывает, что сплайсосомы во внешней среде присутствуют внутри мембранных везикул и удаление этих везикул из асцитов приводит к удалению сплайсосомных U РНК.

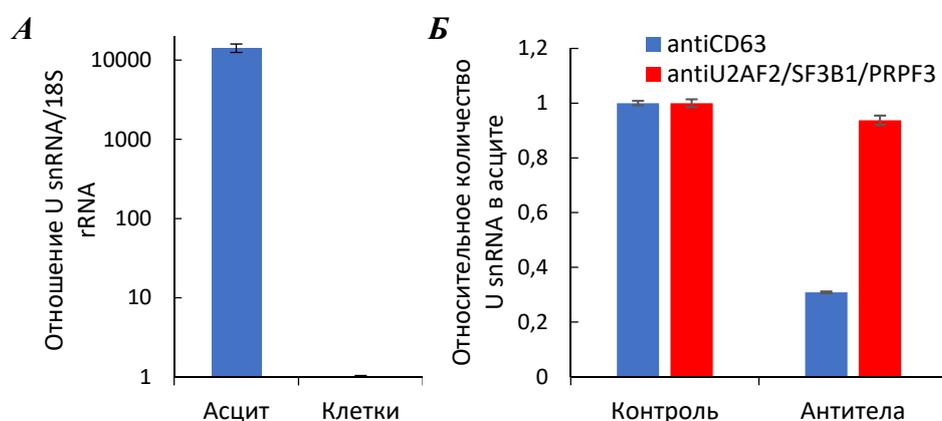


Рисунок 55. А – Отношение количеств U12 РНК сплайсосомы и 18S рибосомальной РНК в асцитических жидкостях, полученных от пациентов с раком яичников после терапии, и в культуре клеток рака яичника. Б – Деpletion U6 сплайсосомной РНК в асцитических жидкостях с помощью различных антител, иммобилизованных на магнитных частицах.

Для того чтобы дополнительно подтвердить эти данные на клинических образцах, мы проанализировали концентрацию и размер везикул в асцитических жидкостях, полученных от циррозных и опухолевых пациентов. Из **рисунка 56** видно, что асциты, возникающие при раке яичников, действительно содержат гораздо большее количество везикул, чем контрольные

образцы от пациентов с циррозом печени. Эти результаты хорошо согласуются с данными, опубликованными ранее [159].

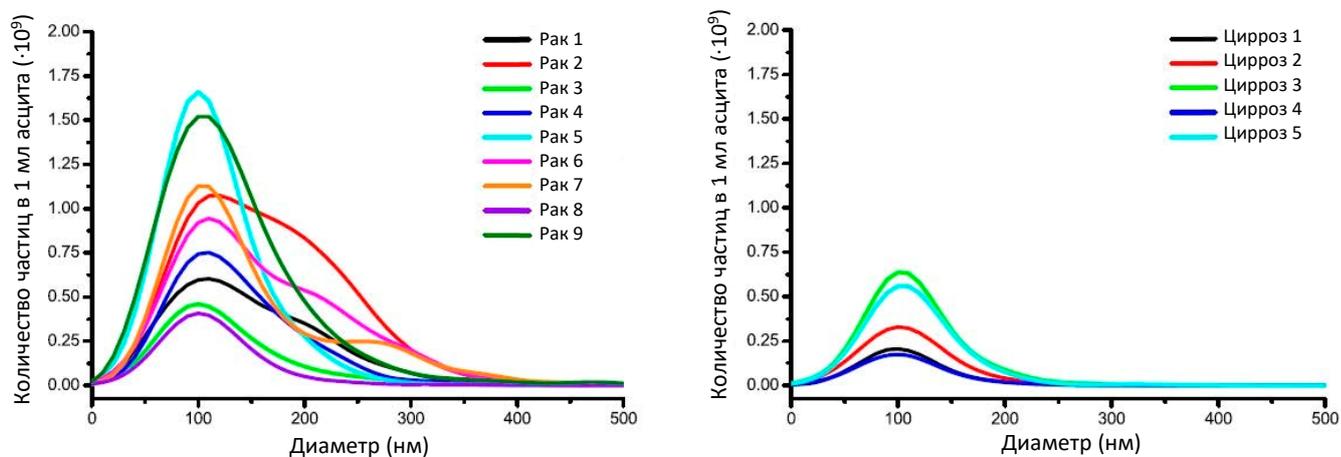


Рисунок 56. Размер и концентрация везикул, выделенных из опухолевых и циррозных асцитов, полученных от разных пациентов.

Известно, что везикулы могут переносить огромное количество разнообразных белков от клетки к клетке, и мы посчитали необходимым определить относительную представленность сплайсосомных белков в общей совокупности белков, поступающих в реципиентные клетки с помощью везикул. Для достижения этой цели мы воспользовались методом SILAC (Stable Isotope Labeling by Amino acids in Cell culture). В ходе нашего эксперимента мы выращивали клетки рака яичника линии SKOV3 на среде, содержащей $^{13}\text{C}_6$ лизин и $^{13}\text{C}_6$, $^{15}\text{N}_4$ аргинин до тех пор, пока эффективность включения изотопной метки в клеточные белки не превысит 97% (**Рис. 57А**). После этого мы выделили везикулы, секретированные мечеными клетками-донорами, и добавили их к немеченым клеткам-реципиентам. Далее, используя метод LC-MS/MS масс-спектрометрии, мы определили меченые белки, которые были доставлены везикулами в немеченые клетки. Анализ перенесённых белков показал, что среди них наиболее обогащены именно белки, вовлечённые в процесс сплайсинга пре-мРНК (**Рис. 57Б**).

Суммируя все результаты, приведённые выше, можно сказать, что нами впервые были проанализированы асцитические жидкости, полученные от пациентов до и после лечения. Эти данные впервые продемонстрировали, что под действием терапии клетки рака яичника специфически секретируют во внешнюю среду РНК и белковые компоненты сплайсосом, заключённые внутри мембранных везикул. И, наконец, мы показали, что среди всех белков, переносимых везикулами в реципиентные клетки, наиболее представлены именно белки сплайсосомы [160, 161].

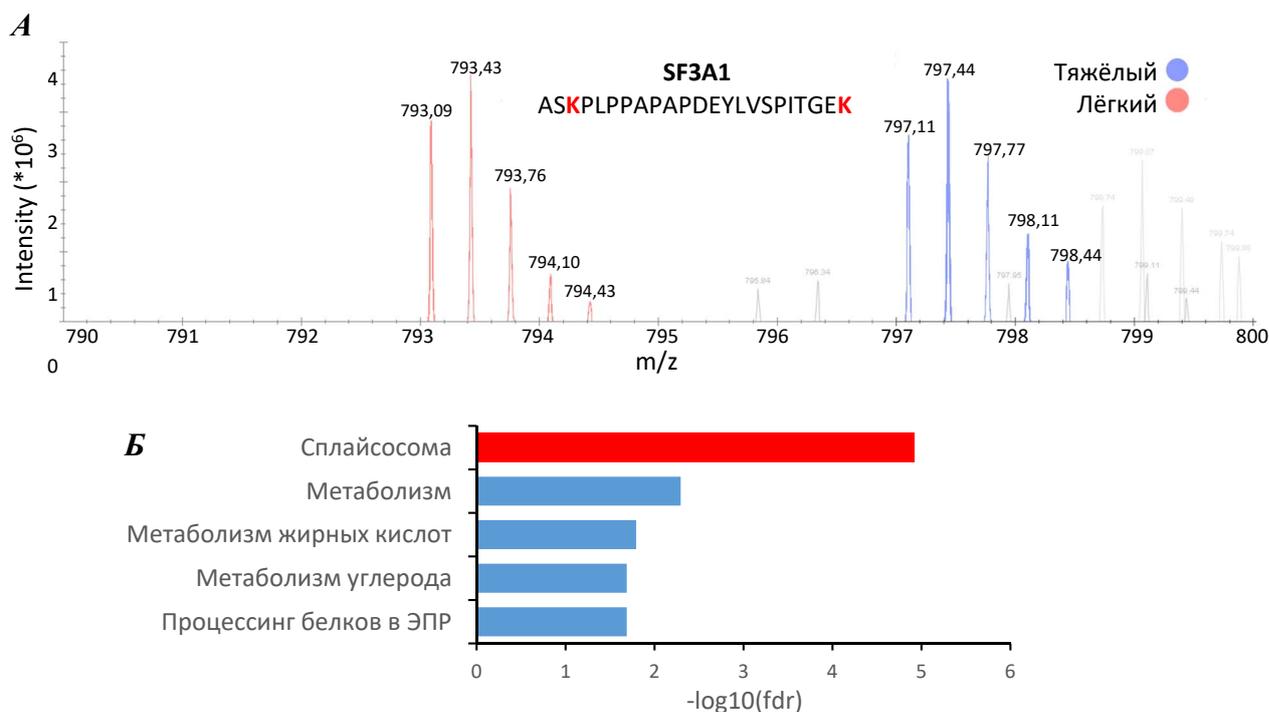


Рисунок 57. А – Масс-спектр белков из клеток рака яичника, выращиваемых на контрольной среде (красный) или на среде, содержащей ¹³C₆ лизин и ¹³C₆, ¹⁵N₄ аргинин (синий). Указаны пики, относящиеся к фрагменту белка сплайсосомы SF3A1. Б – Анализ обогащения изотопно-меченных белков, идентифицированных в немеченых клетках рака яичника после их инкубации с везикулами, секретированными изотопно-мечеными клетками.

4.2.2. Изучение межклеточных сигналов, продуцируемых клетками глиобластомы после сеансов химио- и радиотерапии.

Хотя асциты и представляют собой крайне удобную модель для исследования, они имеют не слишком высокое значение для клинической практики, так как в большинстве случаев формируются лишь на последней стадии рака яичников, когда опухолевые клетки уже образовали многочисленные метастазы. Поэтому следующие этапы нашей данной работы были выполнены на более клинически значимой, хотя и довольно сложной модели - раке головного мозга, глиобластоме. Одной из причин выбора именно этого заболевания стало то, что из-за недостатка питательных веществ, крайне ограниченного пространства для роста и очень быстро увеличивающейся клеточной массы, существенную часть опухоли занимает некротическая зона с большим количеством апоптотических клеток (**Рис. 58А**) [140]. Из-за этого мы резонно предположили, что роль апоптотических клеток в развитии данного типа новообразований может быть очень велика.

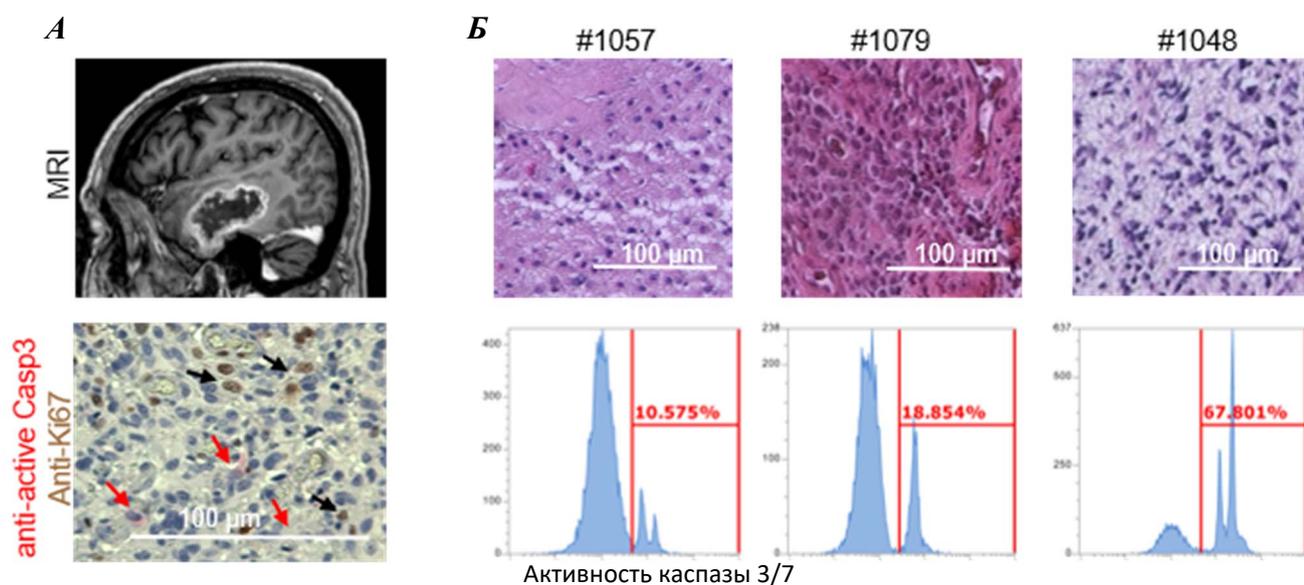


Рисунок 58. А – МРТ пациента с глиобластомой (сверху) и окраска среза глиобластомы человека антителами на маркёр апоптоза (активированная каспазу-3) и маркёр пролиферации (Ki67) (снизу). Б – Окраска гематоксилином и эозином срезов глиобластомы, полученных от трёх различных пациентов, (сверху) и определение уровня апоптоза методом проточной цитофлуориметрии в соответствующих опухолях (снизу).

Для подтверждения такой гипотезы в первую очередь мы определили содержание апоптотических клеток в глиобластомах, полученных от пяти разных пациентов. Важно отметить, что время от хирургического удаления опухоли до анализа клеток никогда не превышало 4х часов. Из **рисунка 58Б** видно, что апоптотические клетки составляют от 10% до 70% всех опухолевых клеток, что говорит о потенциально большом влиянии этих клеток на «здоровые» опухолевые клетки.

Следующим шагом мы решили подтвердить на глиобластоме данные, которые были получены ранее на раке яичника. Для этого мы выделили везикулы, секретированные первичной культурой «здоровых» клеток глиобластомы (далее такие везикулы мы обозначаем как “EVs”) и апоптотическими клетками глиобластомы от того же пациента (далее такие везикулы мы обозначаем как “apoEVs”). LC-MS/MS анализ показал, что apoEVs действительно обогащены сплайсосомными белками (**Рис. 59А**). Мы подтвердили результаты масс-спектрометрии с помощью иммуноблоттинга с антителами на 7 различных сплайсосомных белков (PRPF8, U2AF2, SF3A3, SF3B1, HNRNPU, HNRNPA2B1, HNRNPC) и 5 маркёров экзосом (Alix, CD9, CD63, CD81, TSG101 [162]) (**Рис. 59Б**). Согласно нашим данным, apoEVs имеют все основные маркёры экзосом и содержат коровые сплайсосомные белки, относящиеся ко всем сплайсосомным комплексам (**Рис. 60**). Эти белки осуществляют химическую реакцию разрезания и сшивания

молекул пре-мРНК и присутствуют на высоком уровне во всех человеческих клетках [163]. Важно отметить, что помимо коровых белков сплайсосомы мы также обнаружили большое количество белков семейств SR и hnRNP (так называемых факторов сплайсинга), заключённых внутри апоEVs. Функция этих белков заключается в регуляции специфичности реакции сплайсинга, то есть в выборе тех сайтов сплайсинга, по которым будет удаляться интрон. Конкурируя друг с другом, эти белки определяют то, какая именно изоформа мРНК получится в ходе реакции сплайсинга пре-мРНК [164]. В отличие от коровых белков сплайсосомы, экспрессия сплайсинговых факторов строго тканеспецифична и может меняться в ответ на разнообразные воздействия на клетку.

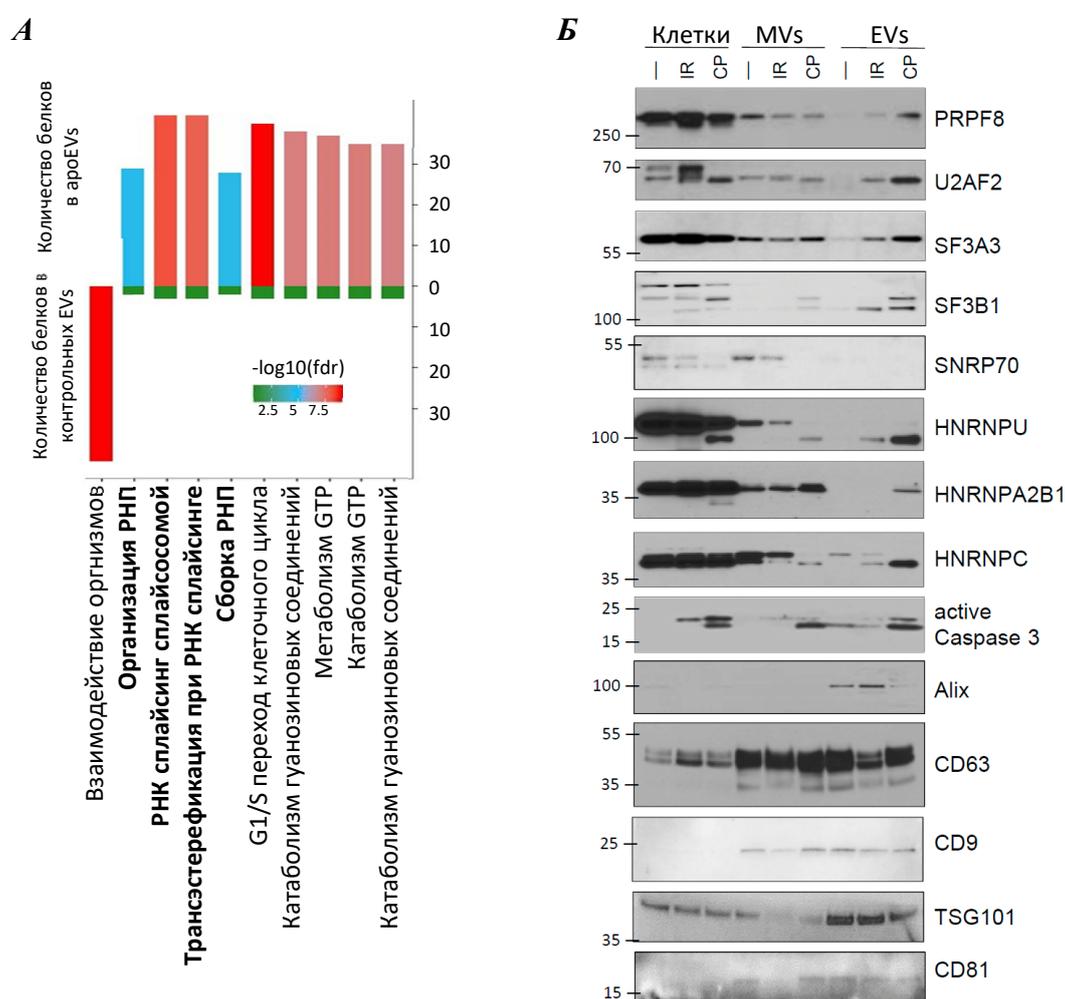


Рисунок 59. *А* – Анализ обогащения белков, идентифицированных в везикулах, секретируемых контрольными и апоптотическими клетками глиобластомы. *Б* – Детекция белков методом иммуноблотинга в клетках глиобластомы и в различных фракциях везикул, секретируемых этими клетками в нормальных условиях (–) и после обработки клеток цисплатином (CP) или γ -излучением в дозе 12 Гр.

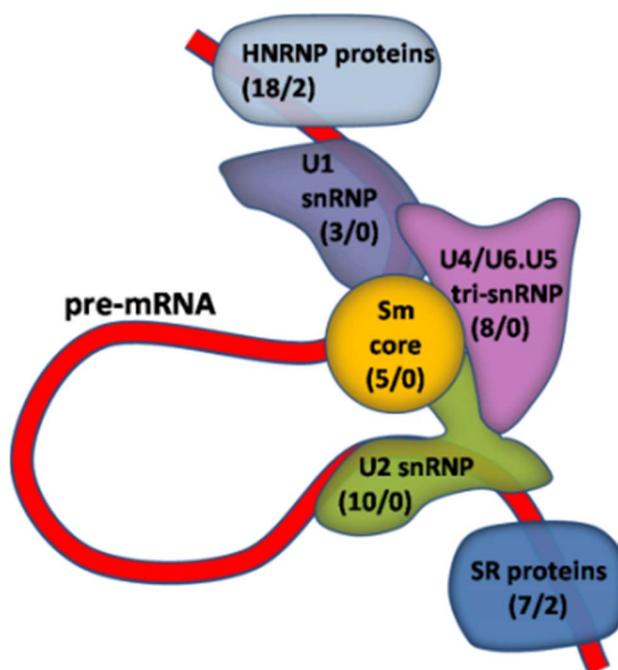


Рисунок 60. Схематическое изображение сплайсосомы с указанием различных комплексов и количества белков, относящихся к этим комплексам, которые были идентифицированы в *ароEVs* и в контрольных везикулах (*ароEVs/EVs*).

Как упоминалось выше, белки сплайсосомы (в особенности коровые) существуют в комплексе с некодирующими уридин-богатыми РНК. По этой причине следующим шагом мы показали, что *ароEVs* обогащены всеми типами сплайсосомных U РНК (U1, U2, U4, U5, U6, U11, U12, U4^{АТАС}, U6^{АТАС}). Важно отметить, что мы не наблюдали обогащения для U7 и U8 некодирующих РНК, которые имеют сходную длину, структуру и локализацию со сплайсосомными U РНК, однако не участвуют в процессе сплайсинга (**Рис. 61А**) [165, 166]. Чтобы доказать, что *ароEVs* действительно могут доставлять значимые количества компонентов сплайсосомы в реципиентные клетки, мы продемонстрировали, что короткая (10 часов) инкубация *ароEVs* с клетками существенно увеличивает количество сплайсосомных U РНК (**Рис. 61Б**) и некоторых сплайсосомных белков в этих клетках.

Подтвердив, что *ароEVs*, секретируемые клетками глиобластомы в процессе терапии, действительно могут доставлять разнообразные компоненты сплайсосом в реципиентные клетки, мы решили максимально возможным образом охарактеризовать эти везикулы. Вначале мы использовали метод анализа траектории движения наночастиц (NTA) и показали, что средний размер *ароEVs* лежит в диапазоне 100-180 нм, что совпадает со средними размерами экзосом. Интересно отметить, что обработка клеток γ -излучением почти в два раза увеличивает

суммарную секрецию везикул. Таким образом, можно предположить, что количество ароEVs,

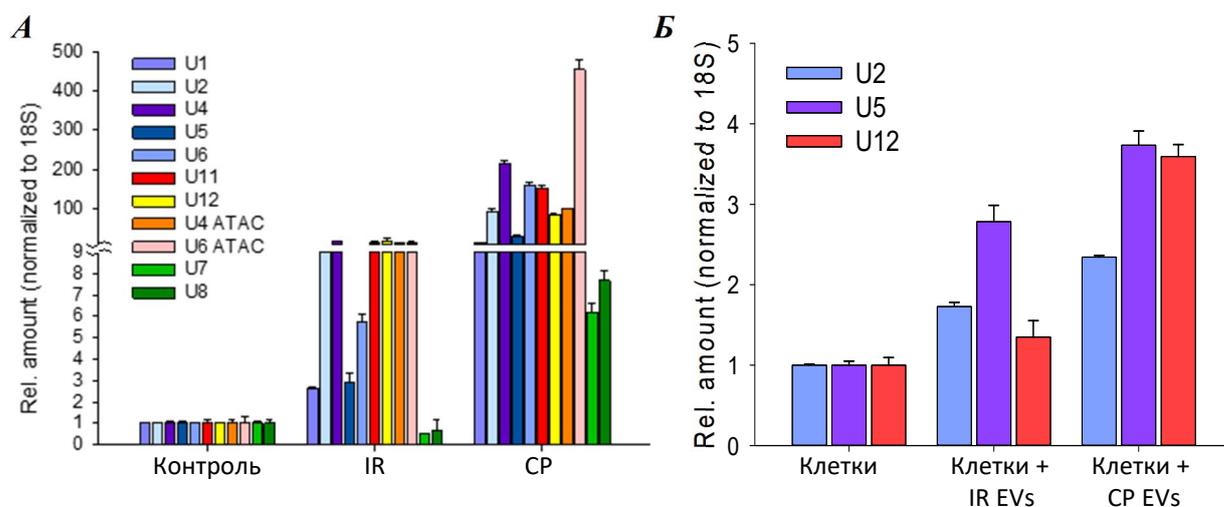


Рисунок 61. А – Относительное содержание РНК сплайсосомы (U1, U2, U4, U5, U6, U11, U12, U4^{ATAC} и U6^{ATAC}), а также контрольных РНК (U7, U8) в везикулах, секретированных контрольными клетками глиобластомы, клетками, обработанными γ -излучением (IR), и клетками глиобластомы, обработанными цисплатином (CP). Б - Относительное содержание РНК сплайсосомы (U2, U5, U12) в клетках до и после 10 часовой инкубации с ароEVs.

секретируемых клетками в ходе терапии, по меньшей мере не уступает количеству экзосом, продуцируемых в нормальных условиях (**Рис. 62А**). Следующим шагом, мы окрасили везикулы антителами на сплайсосомный белок U2AF2 и, используя метод флуоресцентного NTA, показали, что сплайсосомные белки действительно переносят небольшие частицы с размером 50-100 нм (**Рис. 62Б**). Снижение среднего размера частиц в сравнении с результатами первого эксперимента мы связываем с фиксацией и обработкой везикул детергентом, которая была необходима, чтобы окрасить внутреннее содержимое везикул антителами.

Далее мы выделили везикулы и изучили их структуру с помощью трансмиссионной электронной микроскопии. Как видно из **рисунка 62В**, ароEVs имеют характерную для экзосом чашевидную форму [167], хотя, по ещё не до конца понятным причинам, их мембрана гораздо ярче контрастируется уранилацетатом, чем мембраны контрольных EVs.

В заключение, чтобы увидеть непосредственно процесс переноса сплайсосомных белков в реципиентные клетки с помощью везикул, мы выделили ароEVs и инкубировали их в течение 10 часов с реципиентными клетками глиобластомы. После этого мы окрасили клетки антителами к сплайсосомному белку SF3A1 и вторичными антителами, конъюгированными с золотыми нано

частицами. Получив ультратонкие срезы клеток, мы проанализировали их на трансмиссионном электронном микроскопе. Как видно из **рисунка 62Г** реципиентные клетки действительно имеют большое количество золотых наночастиц в эндосомах, расположенных у поверхности клеточной мембраны, и почти не содержат меток в цитоплазме. Такая картина говорит в пользу того, что уже через 10 часов инкубации с apoEVs реципиентные клетки с помощью эндосом захватывают значительное количество везикул, содержащих сплайсосомы, из внеклеточной среды.

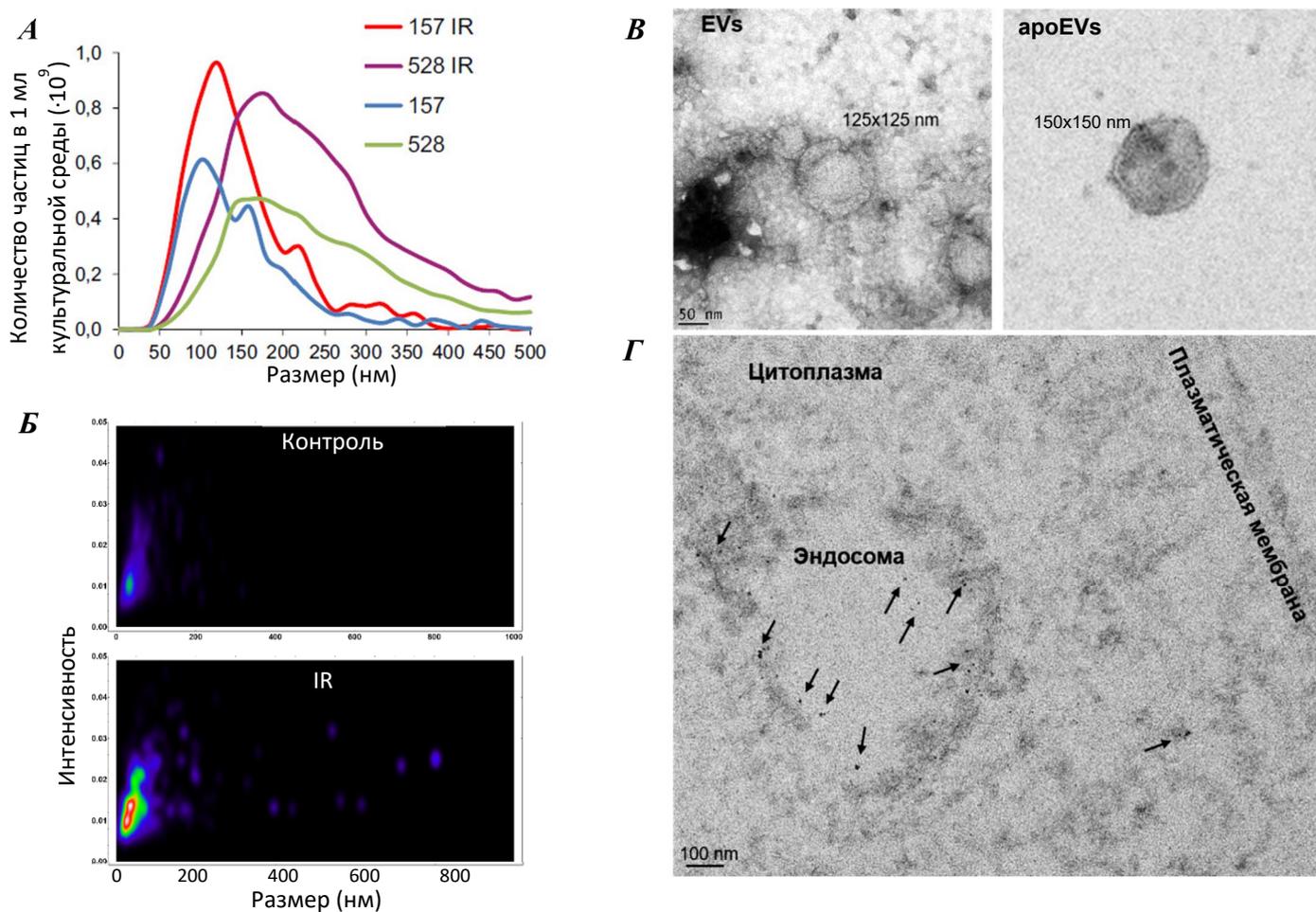


Рисунок 62. А – Размер и концентрация везикул в культуральной среде двух первичных линий глиобластомы до и после обработки клеток γ -излучением (IR). Б – Размер, интенсивность окраски и относительная концентрация (обозначена цветом) везикул, выделенных из культуральной среды клеток глиобластомы и окрашенных флуоресцентно-мечеными антителами к белку U2AF2. В – электронные микрофотографии apoEVs и контрольных EVs, секретируемых клетками глиобластомы. Г – электронная микрофотография ультратонкого среза клетки, которая инкубировалась в течение 10 часов с apoEVs и затем была окрашена антителами к сплайсосомному белку SF3A1 и вторичными антителами, конъюгированными с золотыми наночастицами.

Чтобы подтвердить, что сплайсосомные белки переносятся именно внутри мембранных везикул, а не в каких бы то ни было белковых агрегатах, мы выделили apoEVs и обработали их протеиназой К в отсутствие или в присутствии детергента. Как видно из **рисунка 63А**, без детергента протеиназа К не способна расщеплять сплайсосомные белки и, таким образом, можно с уверенностью утверждать, что эти белки содержатся именно внутри мембранных везикул, поверхность которых защищает внутреннее содержимое от деградации протеазами [168].

Наконец, для того чтобы показать, что apoEVs, обогащённые сплайсосомными белками, возникают не только *in vitro*, но и в организме пациентов *in vivo*, мы выделили везикулы из плазмы крови пациентов с глиобластомой до и после терапии и продемонстрировали, что для большинства больных характерно существенное увеличение количества сплайсосомного белка U2AF2 в везикулах, полученных после лечения (**Рис. 63Б**).

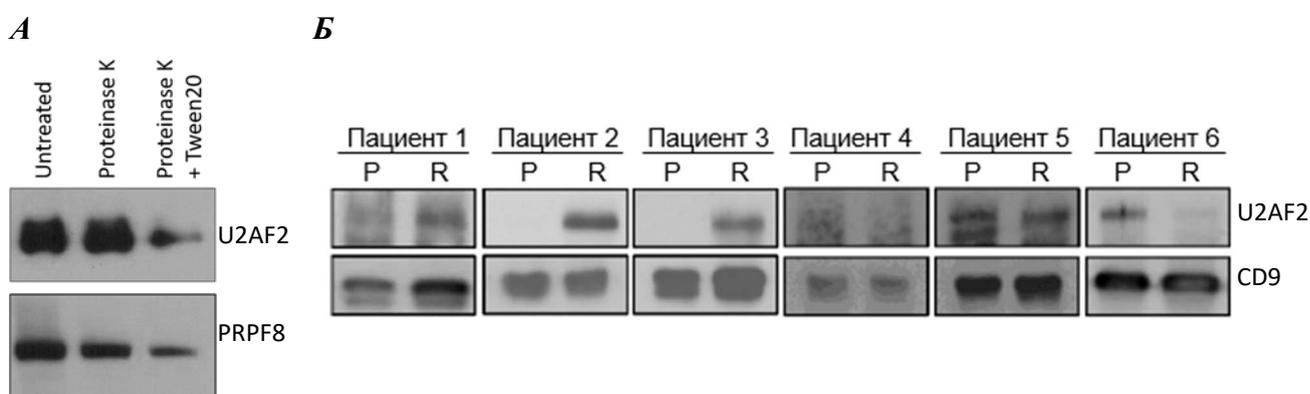


Рисунок 63. *А* – Содержание сплайсосомных белков U2AF2 и PRPF8 в контрольных apoEVs и в apoEVs, обработанных протеиназой К в отсутствие или в присутствии Tween20. *Б* – Содержание белка U2AF2 в везикулах, выделенных из плазмы крови пациентов с глиобластомой до (P) и после (R) терапии.

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

Обнаждённые этими результатами мы приступили к исследованию наиболее интересного для нас вопроса. Дело в том, что сплайсосомы в норме имеют исключительно ядерную локализацию, и до настоящего момента не было данных о том, что они могут покидать ядро и тем более экспортироваться из клетки [169]. Используя первичные культуры клеток глиобластомы *in vitro*, сверхэкспрессирующие флуоресцентно-меченые белки, мы показали, что на ранних стадиях апоптоза сплайсосомный белок PRPF3 диссоциирует от белка ядерного

матрикса Коилина и перемещается в цитоплазму (**Рис. 64А**). Аналогичные результаты были получены с помощью окрашивания антителами эндогенных сплайсосомных белков SF3B1, HNRNPU и HNRNPA2B1. Чтобы подтвердить эти данные, мы использовали метод FISH и показали, что U6 сплайсосомная РНК также перемещается в цитоплазму при индукции апоптоза (**Рис. 64Б**). Наконец, мы окрасили срезы человеческой глиобластомы антителами на ранний маркер апоптоза – фосфорилированный гистон H2AX [170], а также на различные сплайсосомные белки (U2AF2, PRPF8 и NONO) и продемонстрировали, что в апоптотических клетках *in vivo* сплайсосомные белки локализуются в цитоплазме, в то время как в «здоровых» опухолевых клетках они располагаются исключительно в ядре (**Рис. 64В**).

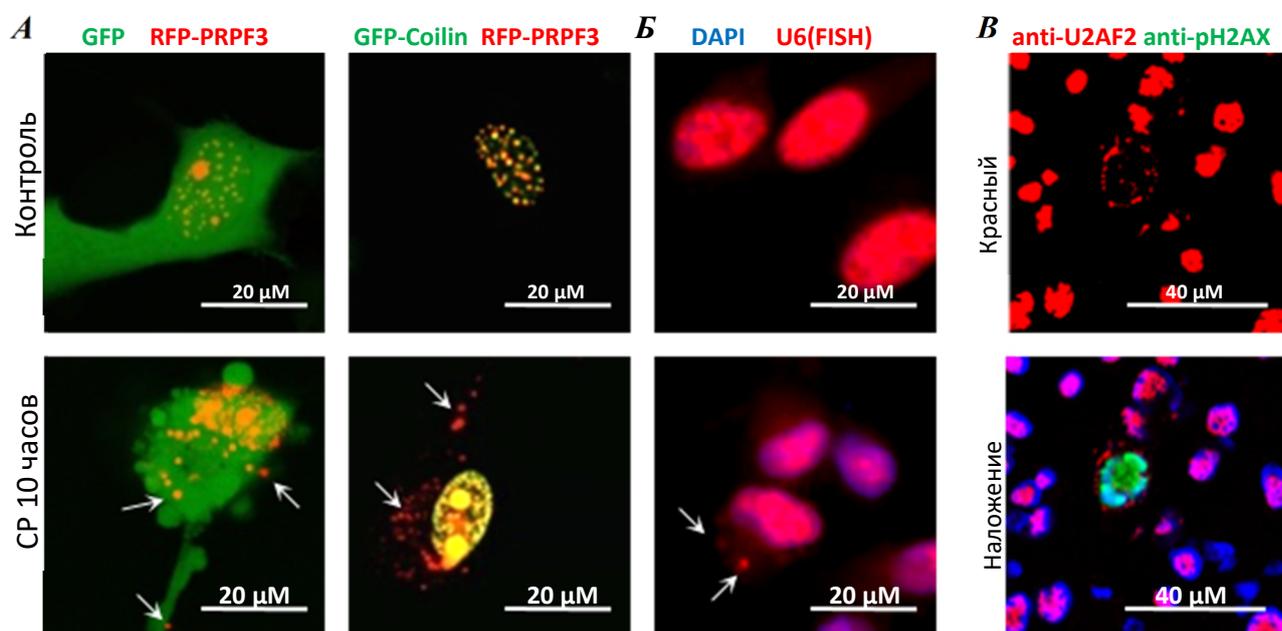


Рисунок 64. А – Флуоресцентные микрофотографии клеток глиобластомы, коэкспрессирующих GFP и RFP-PRPF3 (слева) или GFP-Coilin и RFP-PRPF3 (справа) до и после их обработки цисплатином. Б – Флуоресцентные микрофотографии клеток глиобластомы, обработанных и не обработанных цисплатином и затем окрашенных флуоресцентно-меченным зондом к U6 РНК. В - Флуоресцентные микрофотографии срезов глиобластомы человека, окрашенных антителами к белку U2AF2 и фосфорилированному гистону H2AX.

Следующим шагом мы попытались установить молекулярный механизм экспорта сплайсосом из ядра клетки. В первую очередь, с использованием конфокального микроскопа нам удалось получить изображения везикул, содержащих флуоресцентно-меченые сплайсосомные белки. Для этого мы трансфицировали клетки первичной культуры глиобластомы плазидами, кодирующими RFP-PRPF3 (маркер сплайсосом) и GFP (маркер цитоплазматических белков), и индуцировали апоптоз в этих клетках цисплатином. Фотография на **рисунке 65А** демонстрирует

интересный результат – на ней изображено несколько везикул, часть из которых содержит GFP, и не содержит PRPF3, а другие, напротив, несут большое количество PRPF3 и почти не содержат GFP. Таким образом, можно предположить, что существуют различные популяции везикул, одна из которых, подобно обычным экзосомам переносит цитоплазматические белки, а везикулы другой популяции обогащены сплайсосомными белками. Альтернативное объяснение может заключаться в том, что GFP-содержащие везикулы могли быть секретированы клетками до индукции апоптоза, в то время как PRPF3-содержащие апоEVs- после.

Далее мы проверили, связан ли экспорт сплайсосомных белков из ядра с нарушением целостности ядерной оболочки. Для этого мы трансфецировали клетки глиобластомы плазмидами, кодирующими RFP-PRPF3 (маркёр сплайсосом) и GFP-NLS (маркёр ядерных белков; GFP к которому была добавлена последовательность ядерной локализации). Из **рисунка 65Б** видно, что PRPF3 выходит из ядра на ранних стадиях апоптоза, в то время как GFP-NLS сохраняет исключительно ядерную локализацию вплоть до фрагментации ядра. Эти данные хорошо согласуются с результатами, опубликованными ранее, о том, что ядерная оболочка остаётся интактной вплоть до самых поздних стадий апоптоза [171]. Таким образом, можно утверждать, что перемещение сплайсосом в цитоплазму не связано с дезинтеграцией ядра.

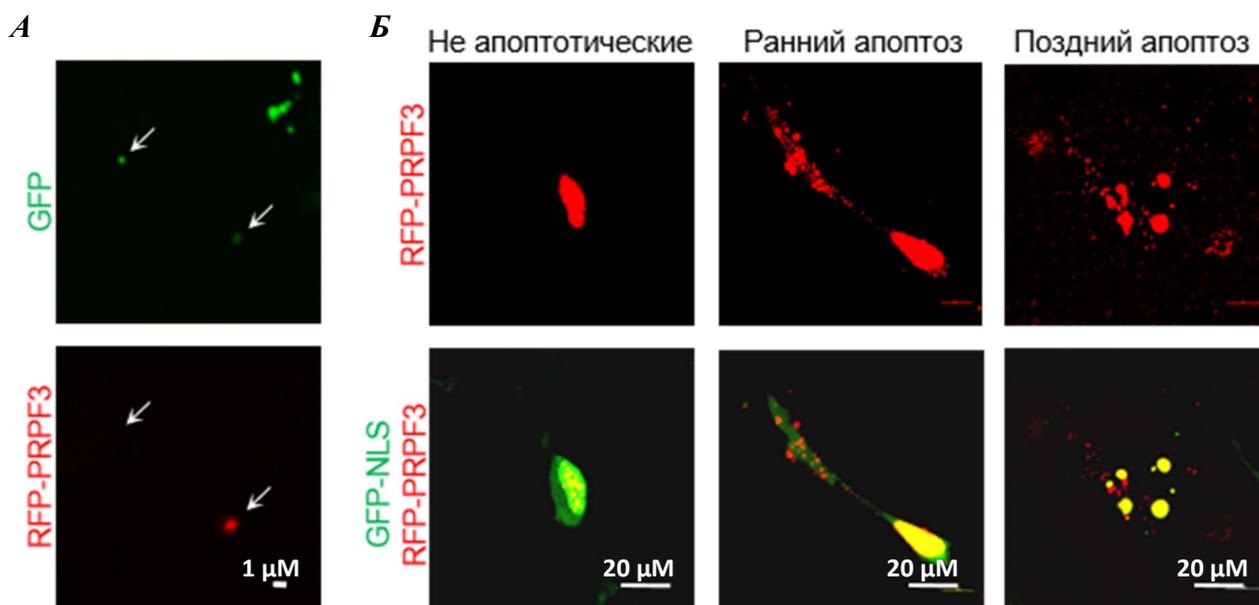


Рисунок 65. А – Флуоресцентные микрофотографии везикул, секретлируемых клетками глиобластомы, коэкспрессирующими GFP и RFP-PRPF3 после их обработки цисплатином. Б – Флуоресцентные микрофотографии клеток глиобластомы, коэкспрессирующими GFP-NLS и RFP-PRPF3 в различные промежутки времени после обработки клеток цисплатином.

Как упоминалось выше, важнейшим признаком апоптоза является активация каспаз. Мы исследовали роль этого процесса в экспорте сплайсосом и показали, что активация каспаз действительно необходима для выхода сплайсосомных белков в цитоплазму. Как видно из **рисунка 66А**, добавление ингибитора каспаз zVAD(OMe)fmk приводит к исчезновению сплайсосомных белков из везикул. Анализируя данные иммуноблотов и масс-спектрометрии, мы заметили, что сплайсосомный белок HNRNPU присутствует в везикулах только в расщеплённой каспазами форме (**Рис. 66Б**). Этот белок важен для закрепления сплайсосом на ядерном матриксе. HNRNPU состоит из двух доменов, одним из которых он взаимодействует с хроматином, а другим со сплайсосомой [172]. Между этими доменами располагается сайт расщепления каспазами (SALD) (**Рис. 66В**). Мы предположили, что расщепление HNRNPU приведёт к потере взаимодействия сплайсосом с ядерным матриксом и позволит им выйти из ядра в цитоплазму. Чтобы проверить эту гипотезу, нами была создана плаزمиды, кодирующая HNRNPU на N- и C-концах которого располагаются YFP и CFP соответственно (**Рис. 66В**).

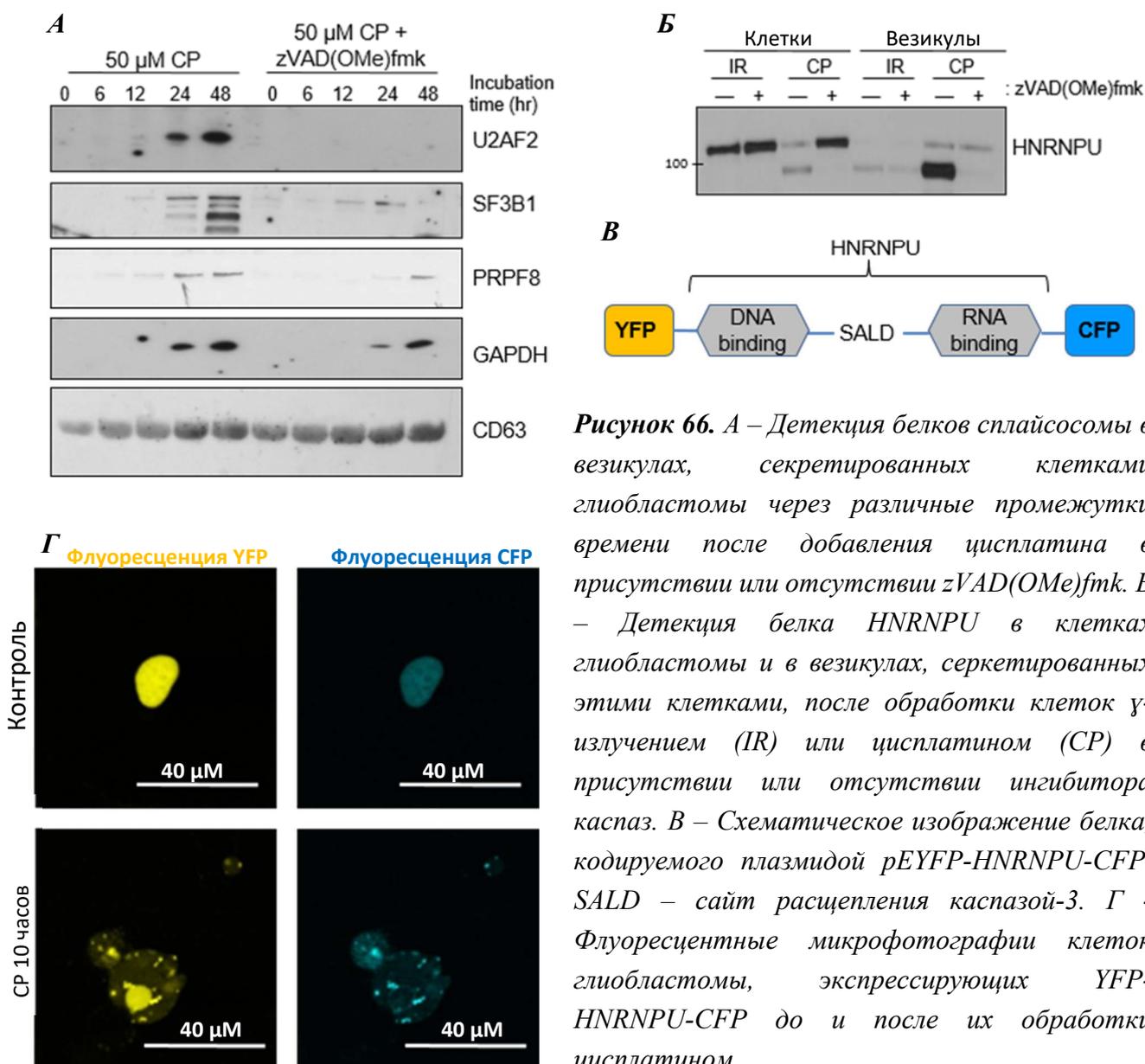


Рисунок 66. А – Детекция белков сплайсосомы в везикулах, секретированных клетками глиобластомы через различные промежутки времени после добавления цисплатина в присутствии или отсутствии zVAD(OMe)fmk. Б – Детекция белка HNRNPU в клетках глиобластомы и в везикулах, секретированных этими клетками, после обработки клеток γ -излучением (IR) или цисплатином (CP) в присутствии или отсутствии ингибитора каспаз. В – Схематическое изображение белка, кодируемого плазмидой pEYFP-HNRNPU-CFP. SALD – сайт расщепления каспазой-3. Г - Флуоресцентные микрофотографии клеток глиобластомы, экспрессирующих YFP-HNRNPU-CFP до и после их обработки цисплатином.

Из **рисунка 66Г** видно, что в контрольных клетках флуоресценция YFP и CFP полностью колокализуется, однако после индукции апоптоза хроматин-связывающий домен, меченый CFP, остаётся в ядре, а РНК-связывающий домен, меченый YFP, покидает ядро. Мы подтвердили эти данные для эндогенного HNRNPU, окрасив апоптотические клетки глиобластомы антителами к С-концевому фрагменту этого белка (**Рис. 67**).

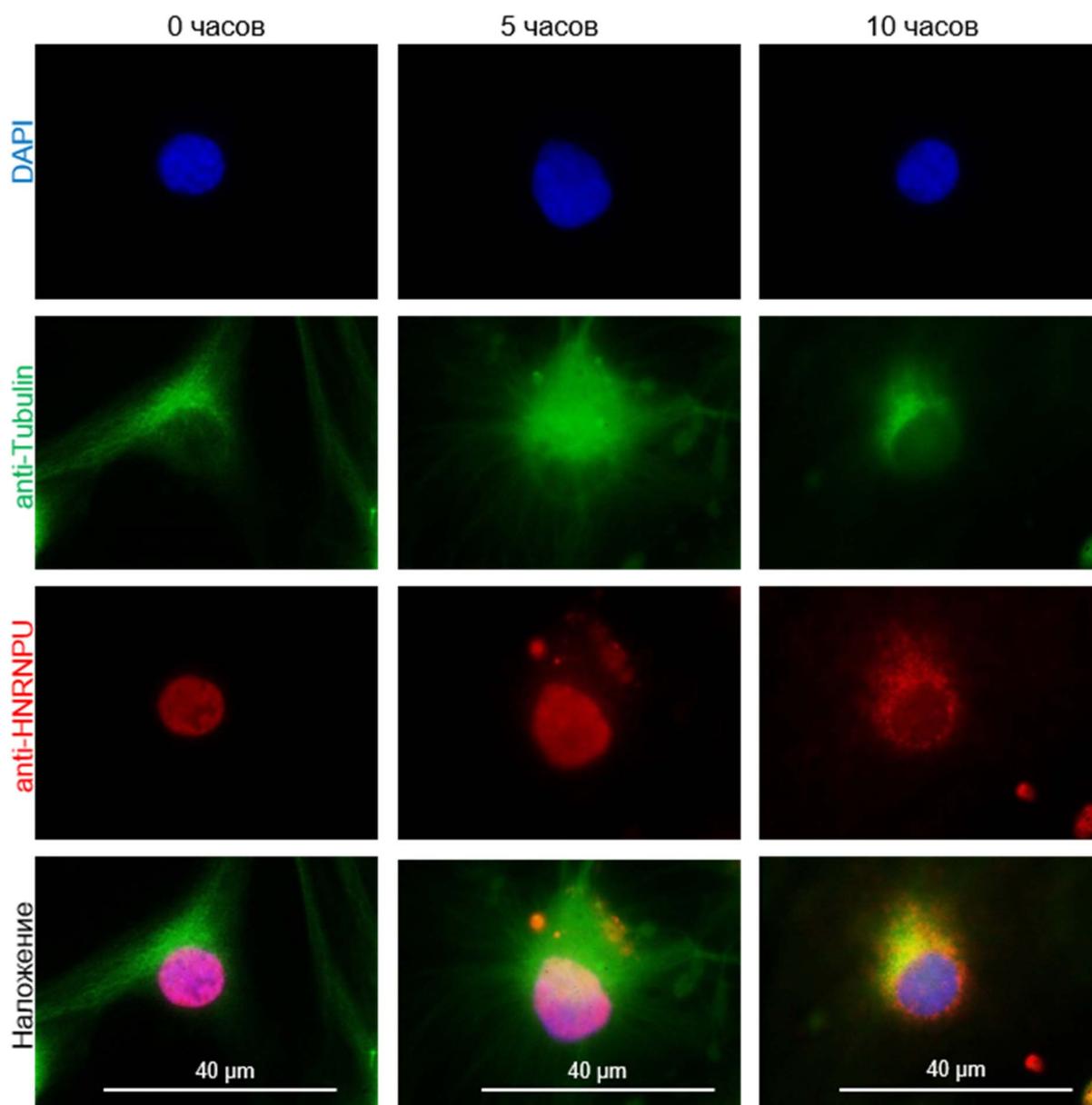


Рисунок 67. Флуоресцентные микрофотографии клеток глиобластомы, инкубированных в течение различного времени с цисплатином, и окрашенных антителами к тубулину (зелёный), С-концевому фрагменту белка HNRNPU (красный) и красителем DAPI (синий).

Приведённые выше результаты говорят о том, что при индукции апоптоза HNRNP1 расщепляется каспазами, и С-концевая часть этого белка, взаимодействующая со сплайсосомой, покидает ядро. Таким образом, можно предположить, что одним из механизмов экспорта сплайсосом в цитоплазму апоптотических клеток является расщепление белков, ответственных за прикрепление сплайсосом к ядерному матриксу.

4.2.3. Изучение роли apoEVs в эволюции глиобластомы.

После того как мы подтвердили, что апоптотические клетки секретируют везикулы, обогащённые компонентами сплайсосом, мы заинтересовались вопросом о биологической роли этих везикул в развитии опухолей головного мозга. Одной из главных загадок в поведении глиобластом является то, что на ранней стадии они все обладают мало агрессивным пронеурональным фенотипом, однако после терапии часто приобретают намного более агрессивный мезенхимальный фенотип [110, 173]. Кроме того, пронеуронально-мезенхимальный переход может происходить и спонтанно по мере роста опухоли [118]. В обоих случаях причины этой трансформации до сих пор остаются загадкой.

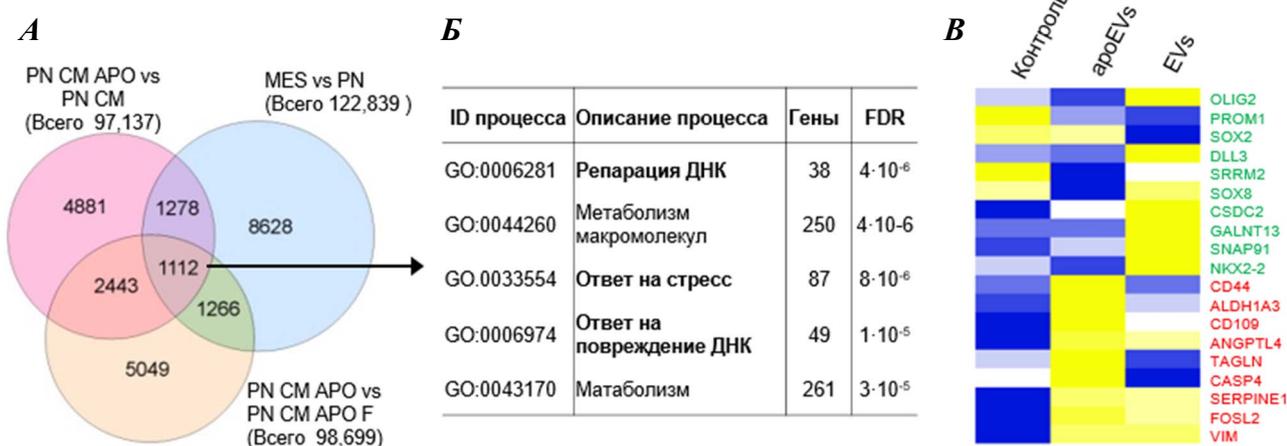


Рисунок 68. А - Диаграмма Венна, иллюстрирующая различия в сплайсинге обнаруженные в трёх сравнениях: различия между пронеурональными и мезенхимальными клетками (голубой); различия между пронеурональными клетками, культивированными со средой, содержащей везикулы от апоптотических и не апоптотических клеток (розовый); различия между пронеурональными клетками, культивированными с фильтрованной или нефильтрованной средой от апоптотических клеток (оранжевый). Б - Анализ обогащения генов, сплайсинг которых был изменён во всех трёх сравнениях. В - Тепловая карта, иллюстрирующая различия в экспрессии пронеурональных (зелёный) и мезенхимальных (красный) маркёров в контрольных клетках, клетках, обработанных apoEVs, и в клетках, обработанных EVs от «здоровых» клеток доноров.

Чтобы узнать могут ли сплайсосомные белки внутри ароEVs влиять на сплайсинг пре-мРНК в реципиентных клетках, и в особенности связаны ли эти изменения с пронейронально-мезенхимальным переходом, мы использовали метод глубокого сиквенирования транскриптома. Вначале мы провели сиквенирование полиаденилированной РНК, выделенной из трёх мезенхимальных и трёх пронейрональных первичных клеточных линий. Проанализировав полученные результаты, мы впервые установили различия в альтернативном сплайсинге между клетками пронейронального и мезенхимального фенотипа глиобластомы. В общей сложности мы обнаружили отличия в сплайсинге пре-мРНК, относящихся к 5297 генам, среди которых были такие важные опухолеассоциированные гены, как MDM2, MDM4, FoxM1, hRAS, Notch1, ATM, TGM2, PKM, Drosha и другие. Следующим шагом мы провели сиквенирование РНК в клетках глиобластомы, культивированных в течение 48 часов с контрольными EVs или с ароEVs. Чтобы убедиться, что изменения в сплайсинге вызваны именно везикулами, а не другими молекулами, секретлируемыми апоптотическими клетками, в качестве дополнительного контроля мы добавляли к реципиентным клеткам среду от апоптотических клеток, из которой везикулы были удалены с помощью фильтрации. Сравнив данные РНК сиквенирования, мы обнаружили, что ароEVs способствуют появлению в реципиентных клетках изоформ, характерных для мезенхимального фенотипа глиобластомы (**Рис. 68А**) [174-177]. Проанализировав функции генов, сплайсинг которых меняется под действием ароEVs, мы показали, что эти гены регулируют репарацию ДНК и ответ клетки на стресс (**Рис. 68Б**). Таким образом, можно предположить, что раковые клетки, погибающие при неблагоприятных воздействиях (в нашем случае γ -излучение), выделяют везикулы, которые позволяют соседним выжившим клеткам «подготовиться» к последующему стрессу за счёт изменений в сплайсинге пре-мРНК. Чтобы подтвердить, что изменения сплайсинга, вызванные ароEVs, приводят к мезенхимальной трансформации, мы провели ещё один эксперимент по сиквенированию транскриптома. Однако в этот раз клетки глиобластомы инкубировались с везикулами в течение 4х, а не 2х дней для того, чтобы установить, как изменение сплайсинга повлияет на транскрипцию нижележащих генов. Проанализировав экспрессию фенотипических маркёров, мы подтвердили, что ароEVs действительно снижают экспрессию маркёров пронейронального фенотипа и увеличивают экспрессию маркёров мезенхимального фенотипа в клетках глиобластомы (**Рис. 68В**).

Получив данные о том, что ароEVs способны влиять на сплайсинг пре-мРНК в реципиентных клетках, мы решили проверить могут ли сплайсосомные белки, доставляемые в клетки с помощью ароEVs, восстанавливать жизнеспособность этих клеток после ингибирования эндогенных сплайсосом. Для этого вначале мы протестировали действие двух ингибиторов сплайсинга: Пладиенолида В (Pladienolide В) и Изогинкгетина (Isoginkgetin) [178] на первичных культурах клеток глиобластомы и на нормальных человеческих астроцитах. Из **рисунков 69А** и

69Б видно, что Изогингетин почти не оказывает влияния на жизнеспособность клеток, в то время как Пладианолид Б эффективно убивает клетки глиобластомы уже в концентрации 10 нМ. Важно отметить, что действие Пладианолида Б на нормальные человеческие астроциты было гораздо слабее. В концентрации 100 нМ этот препарат останавливал их пролиферацию, однако клетки сохраняли жизнеспособность вплоть до концентрации 100 мкМ. Этот результат кажется нам крайне интересным, в особенности если вспомнить о том, что во взрослом организме человека астроциты не пролиферируют и поэтому Пладианолид Б может быть перспективным препаратом для лечения глиобластомы в случае его таргетной доставки в мозг пациентов. Интересно, что до публикации нашей работы действие Пладианолида Б на клетки мозга не тестировалось.

Показав, что Пладианолид Б может эффективно убивать первичные культуры глиобластомы, мы преинкубировали клетки с 20 нМ этого препарата в течение 2х дней. после чего промыли клетки от не связавшегося Пладианолида Б и к одной из групп клеток добавили ароEVs, содержащие экзогенные сплайсосомы. Из данных на **рисунке 69В** видно, что добавление ароEVs эффективно восстанавливает пролиферацию клеток глиобластомы после ингибирования эндогенных сплайсосомных белков, в то время как контрольная группа клеток фактически не делится вплоть до 15го дня эксперимента. Стоит отметить, что согласно нашим данным (**Рис.59Б** и **66А**), ароEVs переносят белок SF3B1 – главную мишень Пладианолида Б. Суммируя всё вышесказанное, можно утверждать, что сплайсосомные белки из ароEVs могут не только изменять тип сплайсинга пре-мРНК в реципиентных клетках, но и восстанавливать активность всего сплайсосомного комплекса после ингибирования корового белка сплайсосомы SF3B1.

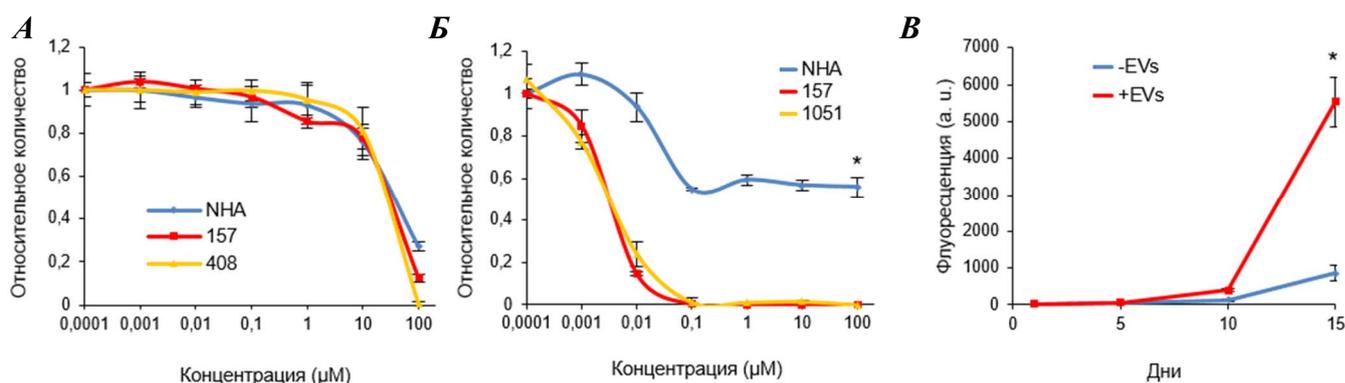


Рисунок 69. А – Действие различных концентраций Изогингетина на жизнеспособность двух первичных линий глиобластомы (157 и 408) и нормальных человеческих астроцитов. Б – Действие различных концентраций Пладианолида Б на жизнеспособность двух первичных линий глиобластомы (157 и 1051) и нормальных человеческих астроцитов. В – пролиферация клеток глиобластомы пре инкубированных с 20 нМ Пладианолида Б в течение 2х дней и затем выращиваемых в присутствии или отсутствии ароEVs в течение 15 дней.

Обнадёженные полученными результатами, мы провели серию экспериментов, чтобы детально изучить влияние apoEVs на фенотип реципиентных клеток глиобластомы. В начале мы исследовали, какие популяции клеток способны захватывать apoEVs. Пометив apoEVs с помощью ковалентной флуоресцентной метки и добавив меченые везикулы к культуре глиобластомы *in vitro* (Рис. 70А) или вколов их в мозг мыши с уже сформированной опухолью *in vivo* (Рис. 70Б), мы показали, что все клетки глиобластомы с высокой эффективностью захватывают apoEVs уже после 16ти часов инкубации. Нам не удалось выявить отдельных популяций клеток, захвативших большее или меньшее количество везикул.

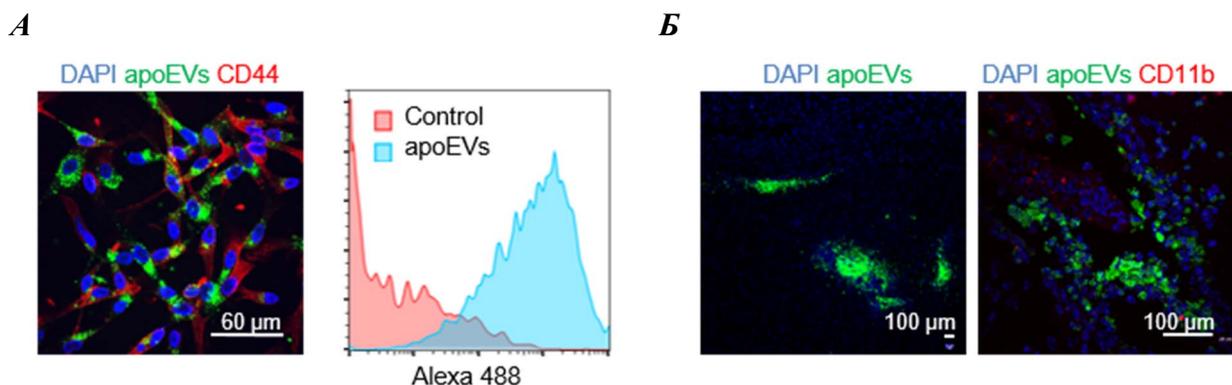


Рисунок 70. А – apoEVs были выделены, помечены с помощью красителя AlexaFluor488-TFP и добавлены в культуральную среду к клеткам глиобластомы. Через 16 часов клетки анализировали с помощью конфокального микроскопа (слева) или проточного цитофлуориметра (справа). Б – меченые apoEVs были инжектированы в мозг мыши с уже сформированной опухолью. Через 16 часов после инъекции мозг животного был зафиксирован, из него были получены тонкие срезы, которые затем анализировались на конфокальном микроскопе при малом (слева) и большом (справа) увеличении.

Далее мы исследовали действие EVs, полученных из различных источников, на пролиферацию клеток глиобластомы. Сравнив везикулы, секретированные клетками глиобластомы, нормальными астроцитами человека и клетками эндотелия мозга при нормальных условиях, после облучения в дозе 12 Гр или после обработки цисплатином, мы показали, что пропролиферативным эффектом обладают только apoEVs, выделяемые клетками глиобластомы (Рис. 71А). Важно отметить, что этот эффект был хорошо воспроизводим, и наблюдался на клетках, полученных от 5ти различных пациентов (Рис. 71Б).

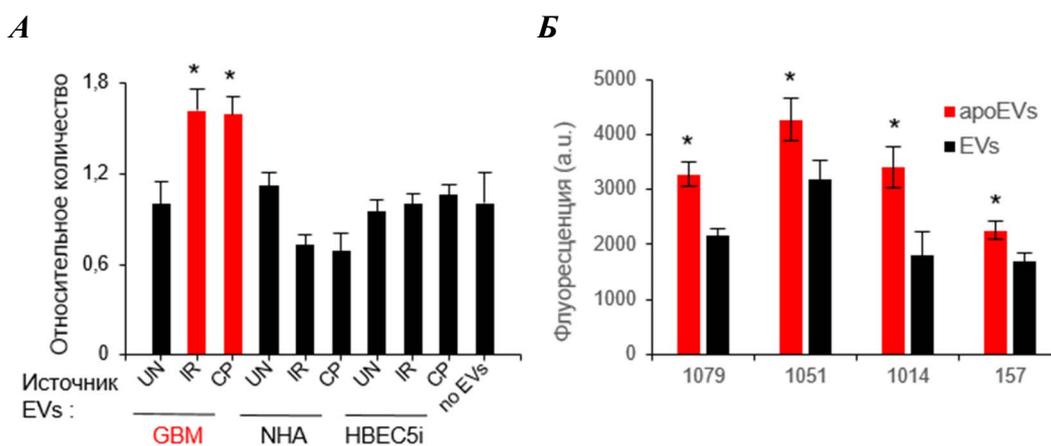


Рисунок 71. А – Относительное количество клеток, культивируемых в течение 7 дней в среде без везикул (по EVs) или с везикулами из различных источников: GBM, NHA, HBEC5i (везикулы, секретируемые клетками глиобластомы, нормальными человеческими астроцитами и иммортализованными клетками эндотелия мозга соответственно); UN, IR, CP (в нормальных условиях, после облучения 12 Гр или после обработки 40 мкМ цисплатина соответственно). Б – относительное количество клеток, культивируемых в течение 7 дней в среде с apoEVs или с контрольными везикулами (EVs), секретированными клетками от того же пациента.

Затем мы определили условия, при которых apoEVs обладают максимальным эффектом на реципиентные клетки глиобластомы. Во-первых, мы продемонстрировали, что влияние apoEVs действительно зависит от их концентрации (**Рис. 72А**). Во-вторых, мы показали, что наиболее активная фракция apoEVs секретируется клетками глиобластомы после облучения 6-12 Гр (**Рис. 72Б**). Эти результаты хорошо согласуются с уровнем апоптоза в клетках-донорах везикул. Так, по нашим данным, наибольшее количество апоптотических клеток возникает при дозе γ -излучения именно в 6-12 Гр, более низкие дозы мало эффективны для индукции апоптоза, тогда как более высокие преимущественно вызывают некроз. В-третьих, согласно нашим данным, наибольшим эффектом на реципиентные клетки обладают apoEVs, секретированные на 3-6 день после индукции апоптоза с помощью γ -излучения (**Рис. 72В**). Эти результаты также совпадают с динамикой активации каспаз в клетках-донорах везикул. Наконец, мы продемонстрировали, что сильнее всего на клетки действует фракция везикул, седиментирующая при центрифугировании в 120 000g, что соответствует условиям, обычно используемым для выделения экзосом (**Рис. 72Г**). Суммируя все перечисленные выше данные, можно сказать, что наибольшим эффектом обладают EVs, которые были секретированы клетками глиобластомы с самым сильным уровнем активации каспаз, и наиболее активной является фракция EVs по характеристикам сходная с экзосомами [179].

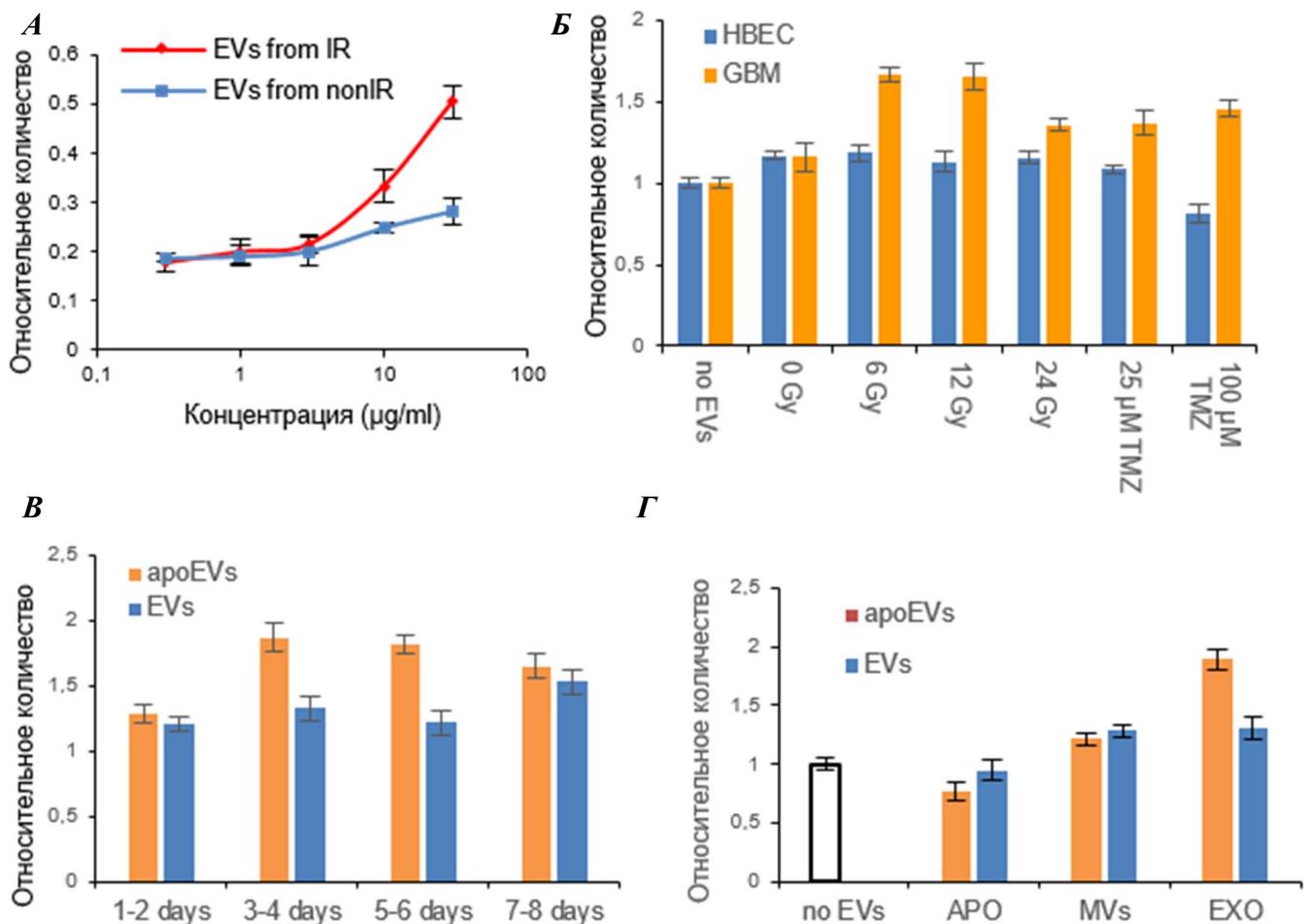


Рисунок 72. А – Относительное количество клеток, культивируемых в течение 7 дней в среде с различной концентрацией apoEVs или контрольных везикул (EVs). Б – Относительное количество клеток, культивируемых в течение 7 дней в среде с apoEVs, секретированными клетками, обработанными различными дозами γ -излучения или различными концентрациями темозоломида (TMZ). В – Относительное количество клеток, культивируемых в течение 7 дней в среде с apoEVs, секретированными в различные промежутки времени после индукции апоптоза дозой γ -излучения в 12 Гр. Г – Относительное количество клеток, культивируемых в течение 7 дней в среде с везикулами, выделенными центрифугированием при различных скоростях (APO – 2 000g, MVs – 16 000g, EXO – 120 000g).

Получив большое количество данных с использованием первичных культур клеток глиобластомы *in vitro*, мы перешли к экспериментам *in vivo*. Для этого мы инжестировали apoEVs в мозг иммунодефицитным мышам вместе с клетками глиобластомы, полученными от того же пациента, что и клетки-доноры apoEVs. Результаты на **рисунке 73** убедительно показывают, что введение везикул вместе с опухолевыми клетками существенно снижает время жизни животных и ускоряет рост опухоли.

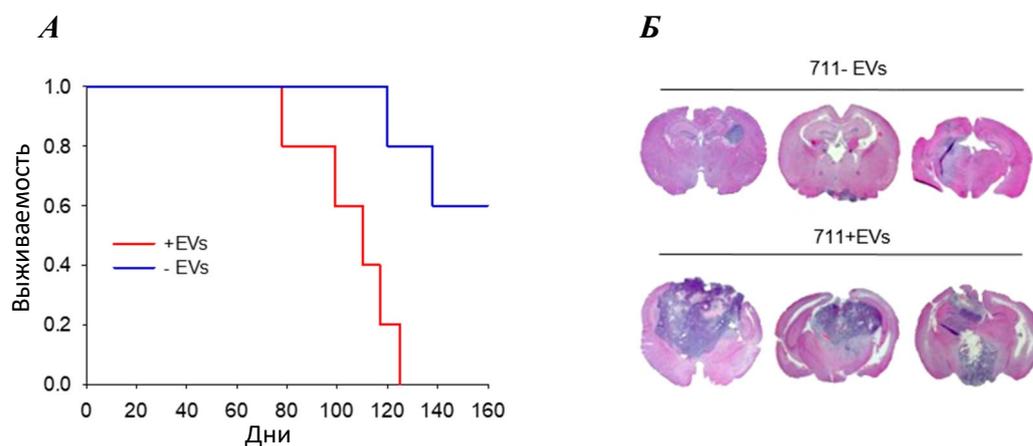


Рисунок 73. А – Кривые Каплан-Майера, показывающие выживаемость иммунодефицитных мышей, в мозг которых были введены клетки глиобластомы человека (синие) или смесь клеток глиобластомы с apoEVs (красное). Б - Репрезентативные изображения опухолей (окраска гематоксилином и эозином), сформированных в иммунодефицитных мышцах, в мозг которых были введены клетки глиобластомы человека или смесь клеток глиобластомы с apoEVs.

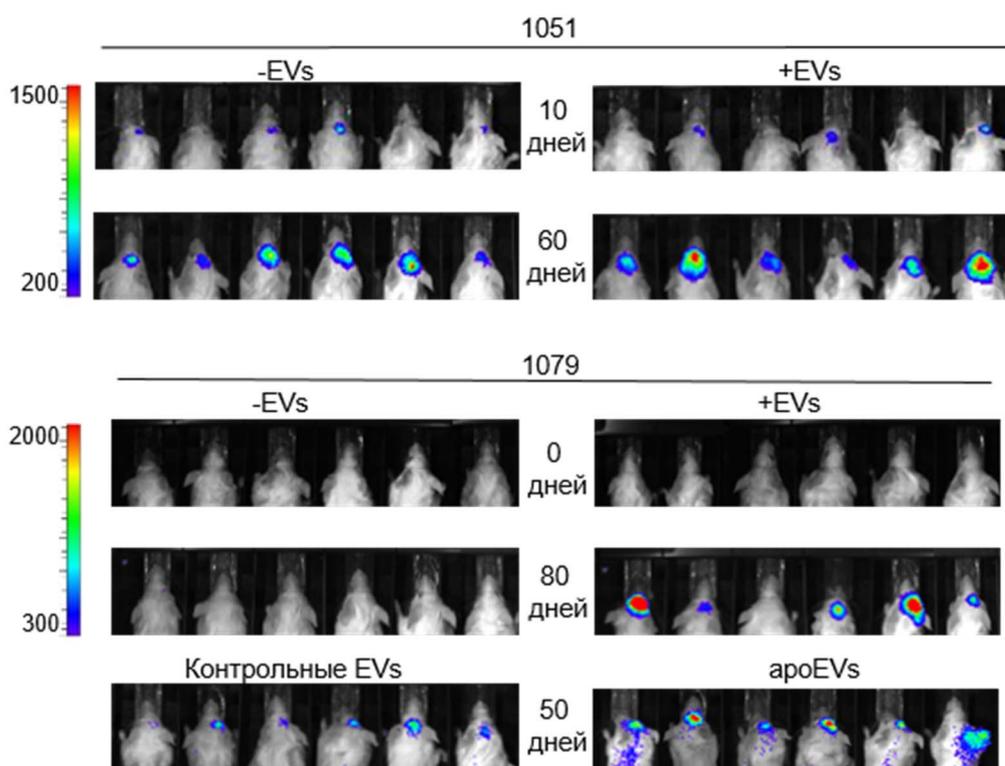


Рисунок 74. Репрезентативные изображения билюминисценции в мозге мышей, которым были трансплантированы меченные люциферазой клетки глиобластомы человека вместе с apoEVs, контрольными везикулами от не апоптотических клеток, или совсем без везикул. В эксперименте использовались клетки, полученные от двух различных пациентов (1051 и 1079).

Чтобы дополнительно подтвердить полученные результаты мы также использовали и другую модель для *in vivo* экспериментов. В следующем опыте мы вводили животным везикулы вместе с клетками глиобластомы, стабильно экспрессирующими люциферазу. Затем, через различные промежутки времени после инъекции размер опухоли определялся по интенсивности биолюминесценции в живых мышах. Важно отметить, что в этих экспериментах донорами EVs являлись клетки, полученные от того же пациента, что и клетки, формирующие опухоль в животных, однако для продукции EVs использовались не меченные люциферазой клетки, что полностью исключает возможность ускорения роста опухоли из-за попадания дополнительного количества раковых клеток, случайно выделенных вместе с везикулами (такая ситуация возможна при использовании в качестве контроля везикул от не апоптотических клеток). Из **рисунка 74** видно, что и в этой экспериментальной модели наблюдается существенное ускорение роста опухоли, вызванное ароEVs, но не контрольными везикулами. Схожие результаты были получены при использовании клеток, выделенных из трёх различных пациентов с глиобластомой.

Проанализировав опухоли, образованные в присутствии и отсутствии ароEVs, мы обнаружили, что ароEVs, вызывают сильнейшее изменение фенотипа глиобластомы *in vivo*, превращая её из пронейрональной (менее агрессивной) в мезенхимальную (более агрессивную). Об этом, во-первых, свидетельствует повышение экспрессии маркёров мезенхимального фенотипа глиобластомы (**Рис. 75А**) и, во-вторых, высокая инвазивность клеток, сформировавших опухоль в присутствии ароEVs. Как видно из **рисунка 75Б**, контрольные животные имеют характерную для менее агрессивных глиобластом чёткую границу между опухолевой и нормальной тканью, однако, клетки, введённые вместе с ароEVs, глубоко мигрируют в нормальный мозг мыши. Стоит отметить, что в данном эксперименте формирование опухоли в мозге животного занимало довольно длительное время (более двух месяцев), тогда как срок существования везикул, введенных вместе с клетками глиобластомы, не превышает нескольких дней. Таким образом, можно утверждать, что фенотипические изменения, вызванные ароEVs, имеют долгосрочный характер и сохраняются длительное время после исчезновения самих везикул. О молекулярном механизме такой долговременной трансформации речь пойдёт в следующей главе.

Показав, что ароEVs способствуют мезенхимальной трансформации глиобластомы *in vivo*, мы решили подтвердить эти данные *in vitro*. Чтобы продемонстрировать, что ароEVs действительно ускоряют миграцию опухолевых клеток, мы измерили скорость передвижения единичных клеток по наноструктурированной поверхности, напоминающей по свойствам строю головного мозга [127]. Согласно нашим данным, преинкубация с ароEVs более чем в 3 раза

увеличивает подвижность клеток глиобластомы *in vitro* (Рис. 75B). Мы дополнительно подтвердили эти результаты с помощью стандартного метода “затягивания рубца” (Рис. 75Г). Далее мы продемонстрировали, что четырёх дневная преинкубация с apoEVs существенно увеличивает экспрессию мезенхимальных маркёров клетками глиобластомы (Рис. 75Г).

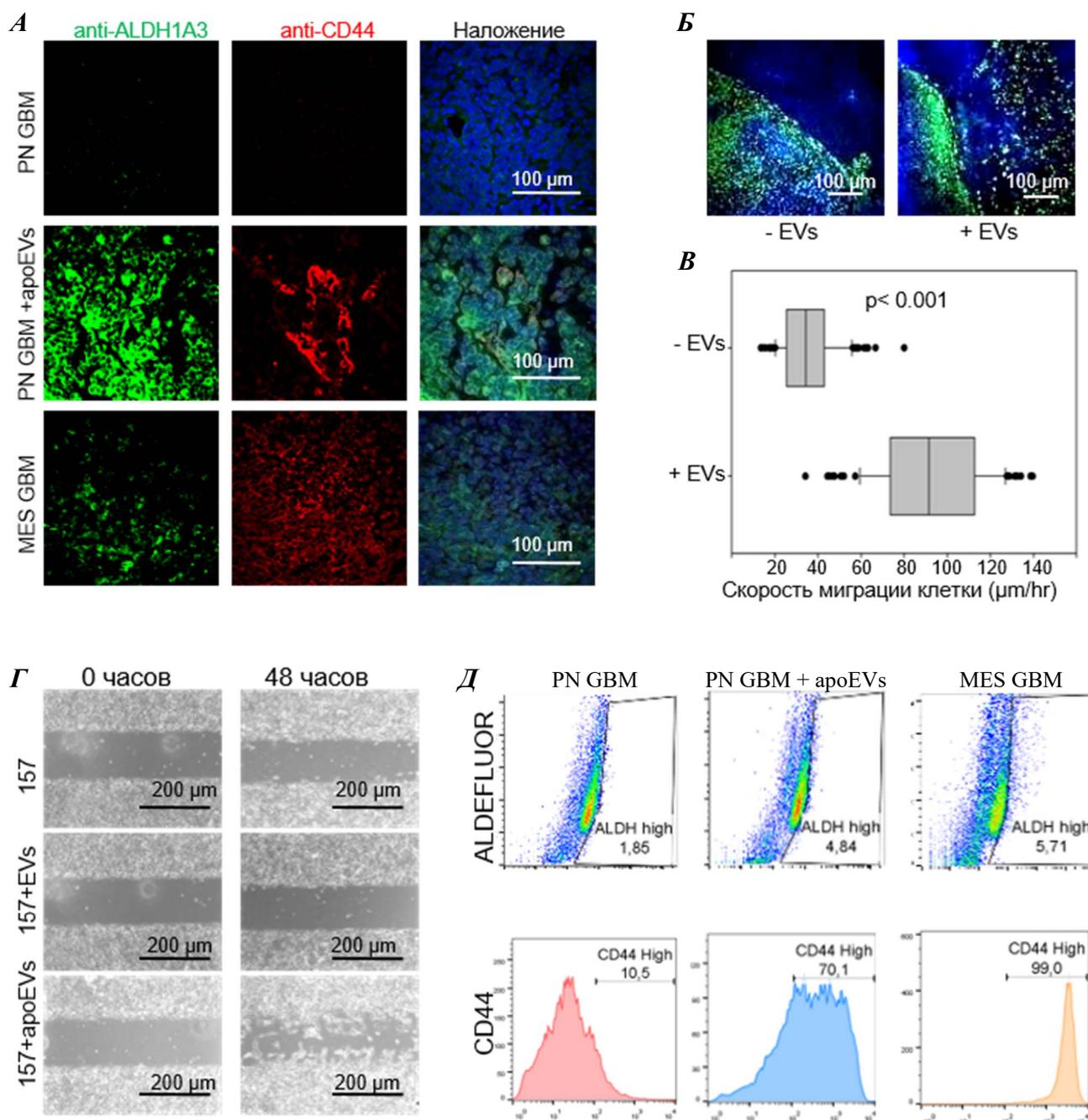


Рисунок 75. А – Срезы мозга мышей, которым были введены клетки глиобластомы человека или смесь клеток глиобластомы и apoEVs. Срезы были получены через 4 месяца после инъекции клеток и окрашены антителами ALDH1A3 и CD44. Опухоль, образованная мезенхимальными клетками, использовалась в качестве положительного контроля. Б – Окраска срезов, полученных так же, как и в «А» антителами на человеческий ядерный антиген. В – Скорость

движения единичных клеток глиобластомы, преинкубированных 4 дня с apoEVs или с контрольной средой. Г – Анализ инвазивности клеток методом “затягивания рубца” для контрольных клеток глиобластомы (157) и клеток глиобластомы, преинкубированных 4 дня с apoEVs или контрольными EVs. Д – Уровень окраски ALDEFLUOR (сверху) и CD44 (снизу) в контрольных пронейрональных клетках глиобластомы и в пронейрональных клетках глиобластомы, преинкубированных 4 дня с apoEVs. Мезенхимальные клетки глиобластомы использовались в качестве положительного контроля. Окрашивание на ALDEFLUOR, ALDH1A3 и CD44 является наиболее часто используемым маркером для мезенхимальных клеток глиобластомы [110].

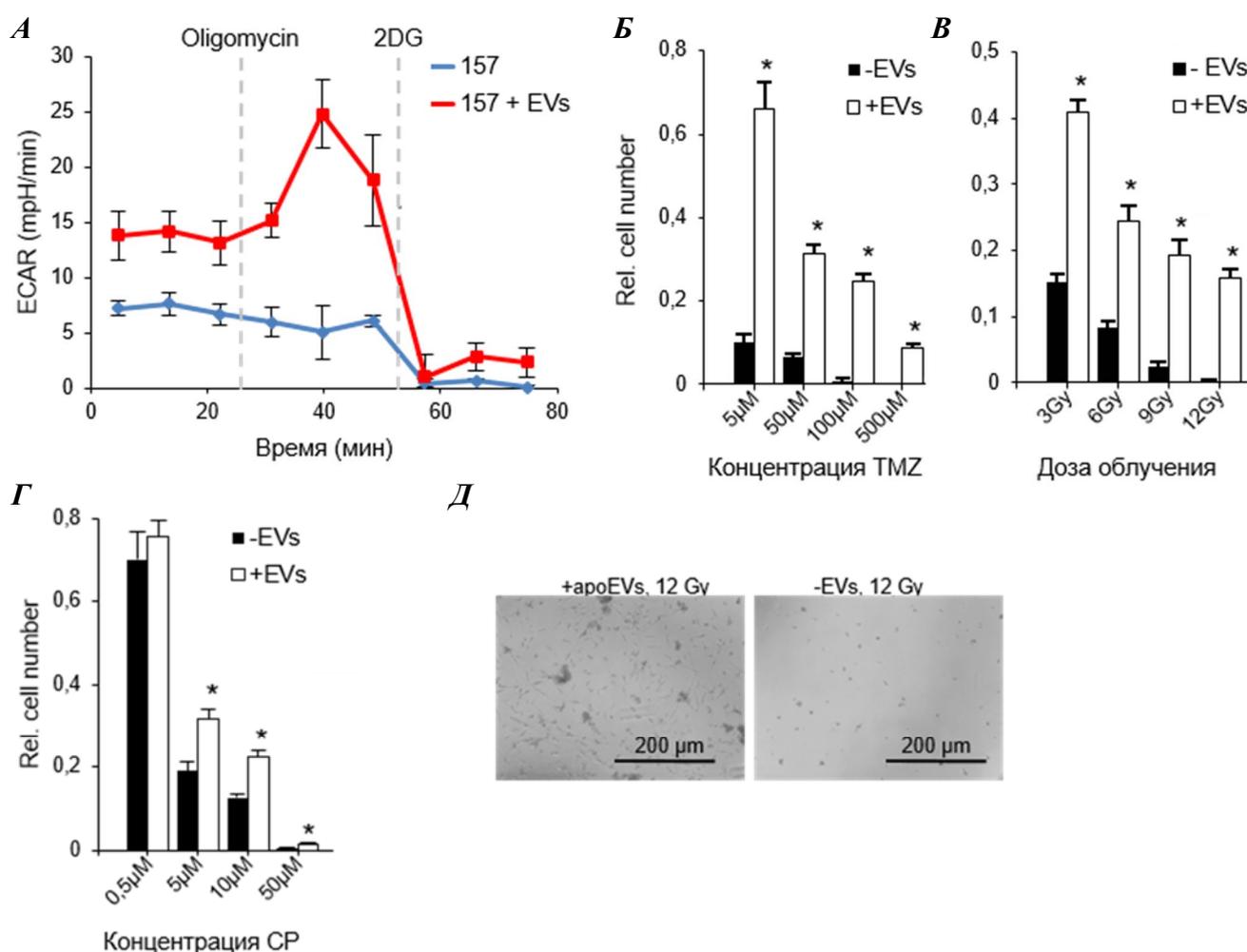


Рисунок 76. А – Скорость закисления среды (ECAR) клетками глиобластомы, преинкубированными 4 дня с apoEVs или с контрольной средой. Олигомицин добавлялся для определения максимально возможной интенсивности гликолиза, а 2-дезоксиглюкоза для определения не гликолитического закисления среды [180]. Б – Влияние темозоламида (TMZ) на выживаемость клеток глиобластомы, преинкубированных 4 дня с apoEVs. В – тоже для γ-

излучения (IR). Г – тоже для цисплатина (CP). Д – Фотография клеток, преинкубированными 4 дня с ароEVs или с контрольной средой, обработанных дозой γ -излучения 12 Гр и инкубированных ещё в течение семи дней.

Однако наиболее важной отличительной чертой мезенхимальных опухолевых клеток является тип их метаболизма. Для мезенхимальных клеток характерен так называемый эффект Варбурга – сдвиг метаболизма от окислительного фосфорилирования к аэробному гликолизу [181, 182]. Чтобы сравнить интенсивность аэробного гликолиза в контрольных клетках и в клетках глиобластомы преинкубированных с ароEVs, мы измеряли скорость закисления среды при последовательном добавлении олигомицина (ингибитор АТФ-синтетазы) и 2-дезоксиглюкозы (ингибитор гликолиза). Из **рисунка 76А** видно, что уже четырёх дней преинкубации с ароEVs достаточно для более чем 2х кратного увеличения уровня аэробного гликолиза в нормальных условиях и более чем 4х кратного увеличения резервных возможностей клетки к гликолизу. При этом изменений в уровне окислительного фосфорилирования замечено не было. Такие данные говорят о драматическом эффекте ароEVs на метаболизм реципиентных клеток.

Наконец, в заключение мы исследовали влияние ароEVs на чувствительность клеток глиобластомы к γ -излучению и таким противоопухолевым препаратам, как темозоламид и цисплатин (**Рис. 76Б-Г**). Из полученных нами данных видно, что преинкубация с ароEVs значительно увеличивает устойчивость глиобластомы к этим видам терапии. Хочется особенно отметить, что доза облучения в 12 Гр вызывала гибель всех контрольных клеток, однако почти 20% клеток, преинкубированных с ароEVs, сохраняли жизнеспособность (**Рис. 76Д**). Такая повышенная резистентность также является важной чертой мезенхимальных клеток глиобластомы.

4.2.4. Исследование молекулярного механизма действия ароEVs на клетки глиобластомы.

Получив результаты о том, что сплайсосомные комплексы внутри ароEVs способствуют мезенхимальной трансформации реципиентных клеток, мы решили определить, какой именно белок сплайсосомы ответственен за этот эффект. Необходимо отметить, что сплайсинг молекул РНК осуществляется при совместном действии коровых белков сплайсосомы и, так называемых, сплайсинговых факторов. Коровые белки экспрессируются на высоком уровне во всех человеческих клетках и осуществляют химическую реакцию сплайсинга пре-мРНК. В отличие от них, сплайсинговые факторы определяют то, как именно будет сплайсирована та или иная

молекула пре-мРНК. Трудно предположить, что наблюдаемые нами изменения сплайсинга могли быть вызваны незначительным увеличением общего количества сплайсосом благодаря поступлению дополнительных сплайсосом в реципиентные клетки из ароEVs. Более вероятно, что ароEVs переносят некоторые «необычные» сплайсинговые факторы, которые не присутствуют или присутствуют на очень низком уровне в реципиентных клетках.

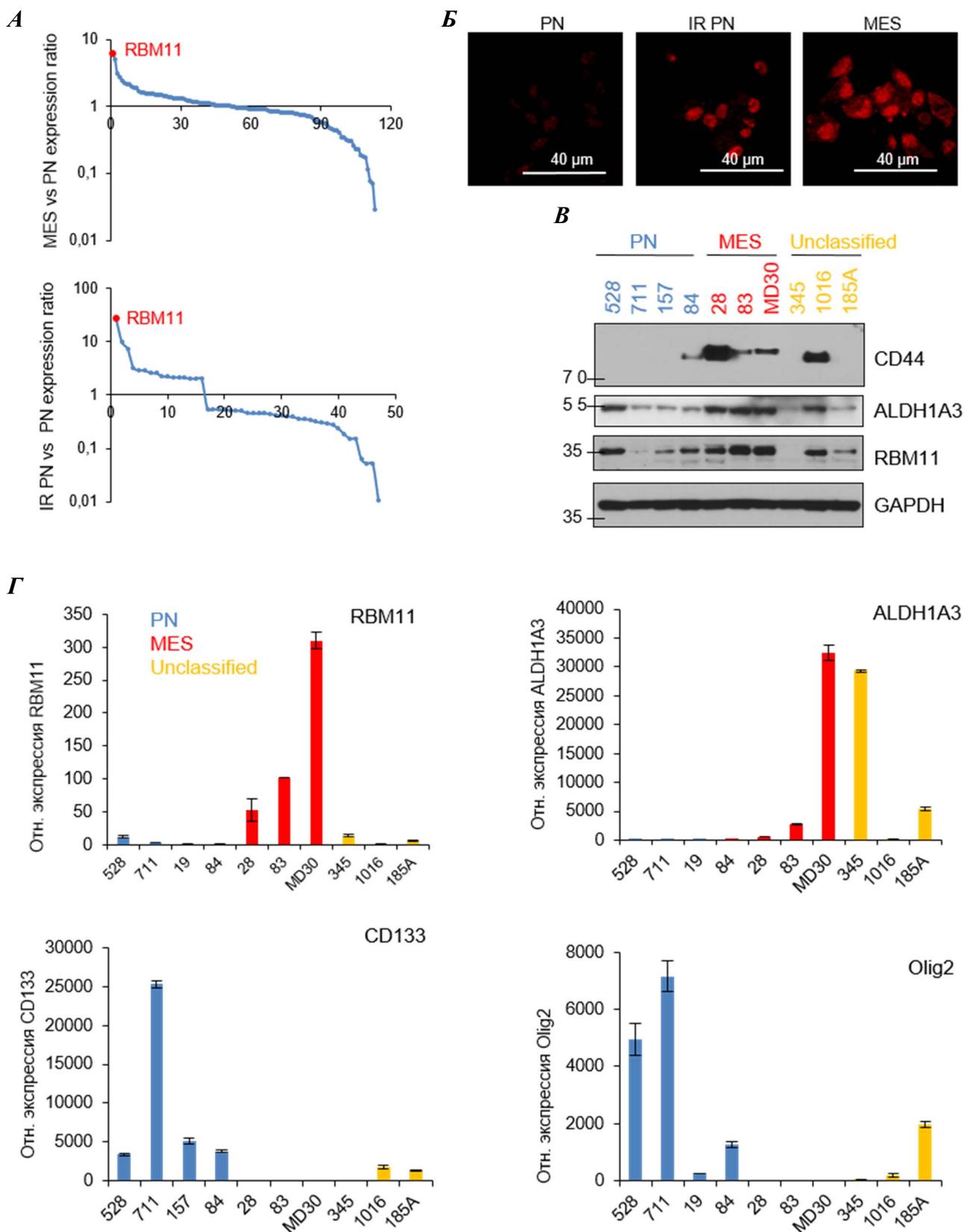


Рисунок 77. А – Отношение экспрессии генов-регуляторов сплайсинга в мезенхимальных и пронейрональных клетках глиобластомы (сверху) и в апоптотических и не апоптотических пронейрональных клетках глиобластомы (снизу). Б – Окрашивание контрольных (PN) и облученных летальной дозой γ -излучения (IR PN) пронейрональных клеток глиобластомы антителами на RBM11. Мезенхимальные клетки (MES) использовались в качестве положительного контроля. В – Детекция CD44, ALDH1A3, RBM11 и GAPDH в пронейрональных (PN), мезенхимальных (MES) и неклассифицированных (Unclassified) первичных культурах клеток глиобластомы методом иммуноблотинга. Г – Детекция RBM11, ALDH1A3, CD133 и Olig2 в пронейрональных (PN), мезенхимальных (MES) и неклассифицированных первичных культурах клеток глиобластомы методом qRT-PCR. CD133 и Olig2 – наиболее часто используемые маркёры пронейрональных клеток глиобластомы [110].

Чтобы проверить нашу гипотезу мы исследовали, как меняется экспрессия сплайсинговых факторов при индукции апоптоза, а также сравнили количества этих белков в пронейрональных и мезенхимальных клетках глиобластомы. Метод микрочипов показал, что при индукции апоптоза наиболее сильно увеличивается экспрессия гена RBM11 (более чем в 30 раз) (**Рис. 77А** сверху). Удивительно, но именно RBM11 также является и сплайсинговым фактором наиболее специфичным для мезенхимальных клеток глиобластомы (**Рис. 77А** снизу). Таким образом, можно утверждать, что индукция апоптоза приводит к тому, что пронейрональные (менее агрессивные) клетки глиобластомы начинают экспрессировать сплайсинговые факторы, характерные для мезенхимальных (более агрессивных) клеток. Мы подтвердили эти данные с помощью иммунофлуоресцентного окрашивания пронейрональных клеток до и после облучения (**Рис. 77Б**), иммуноблотинга (**Рис. 77В**) и qRT-PCR (**Рис. 77Г**). Из **рисунка 77** видно, что во всех 10ти протестированных первичных культурах глиобластомы экспрессия RBM11 положительно коррелирует с экспрессией маркёров мезенхимального фенотипа и отрицательно коррелирует с экспрессией маркёров пронейронального фенотипа глиобластомы. Причём, в мезенхимальных клетках количество мРНК, кодирующей белок RBM11, повышено более чем в 100 раз по сравнению с пронейрональными культурами.

Следующим шагом мы решили установить, чем объясняется столь высокая разница в экспрессии RBM11 между пронейрональными и мезенхимальными клетками глиобластомы. Компьютерный анализ промоторной области гена RBM11 показал, что в ней присутствует так называемый “СрG островок”, длиной около 800 п.н. (**Рис. 78А** сверху). Такие области часто играют важнейшую роль в регуляции экспрессии гена с помощью метилирования ДНК. Используя метод бисульфитного секвенирования, мы сравнили метилирование промотора

RBM11 в пронеурональных и мезенхимальных клетках глиобластомы и показали, что в мезенхимальных клетках промотер RBM11 полностью деметилирован, в то время как в пронеурональных клетках, напротив, во многих позициях уровень CpG метилирования достигает 100% (**Рис. 78А** снизу). Чтобы подтвердить, что метилирование ДНК важно для регуляции экспрессии RBM11, мы добавили в среду к двум линиям пронеурональных клеток глиобластомы ингибитор метилирования ДНК 5-аза-2'-деоксицитидин. Из **рисунка 78Б** видно, что ингибирование метилирования ДНК более чем в 5 раз увеличивает экспрессию RBM11.

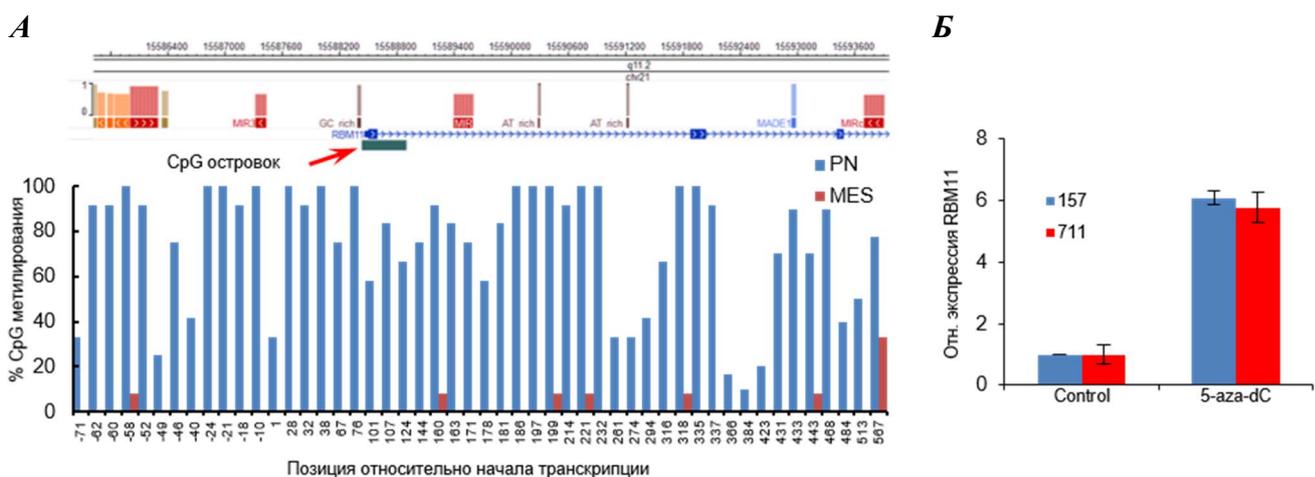


Рисунок 78. А – Схема гена RBM11 (сверху) и уровень метилирования CpG нуклеотидов промотера гена RBM11 в пронеурональных (PN) и мезенхимальных (MES) клетках глиобластомы (снизу). Б – Относительная экспрессия RBM11, определённая с помощью qRT-PCR, в двух пронеурональных линиях глиобластомы, которые были инкубированы в течение 4х дней с 5 мкМ 5-аза-2'-деоксицитидина или с DMSO в качестве контроля.

Получив данные о том, что RBM11 является мезенхимально-специфичным фактором сплайсинга, экспрессия которого многократно повышается в пронеурональных клетках глиобластомы после индукции апоптоза, мы решили проверить, может ли этот белок передаваться между клетками с помощью ароEVs. Для этого мы создали клеточные линии, стабильно экспрессирующие GFP-RBM11 или GFP в качестве контроля, и после индукции апоптоза выделили везикулы, секретируемые этими флуоресцентно-мечеными клетками. Добавив такие везикулы к немеченым клеткам глиобластомы, мы показали, что GFP-RBM11 действительно может переноситься от апоптотических клеток-доноров к «здоровым» реципиентным клеткам с помощью ароEVs (**Рис. 79А**). Важно отметить, что, скорее всего, мы наблюдали именно перенос белка, а не мРНК или ДНК, так как соответствующего переноса GFP между клетками обнаружено не было. Кроме того, хочется подчеркнуть, что RBM11,

доставляемый в клетки с помощью апоEVs, не подвергся деградации и попал в ядро реципиентных клеток. Мы подтвердили эти данные для эндогенного RBM11 методами иммуноблотинга и проточной цитофлуориметрии (**Рис. 79Б**), показав, что захват апоEVs значительно увеличивает количество белка RBM11 в реципиентных клетках глиобластомы.

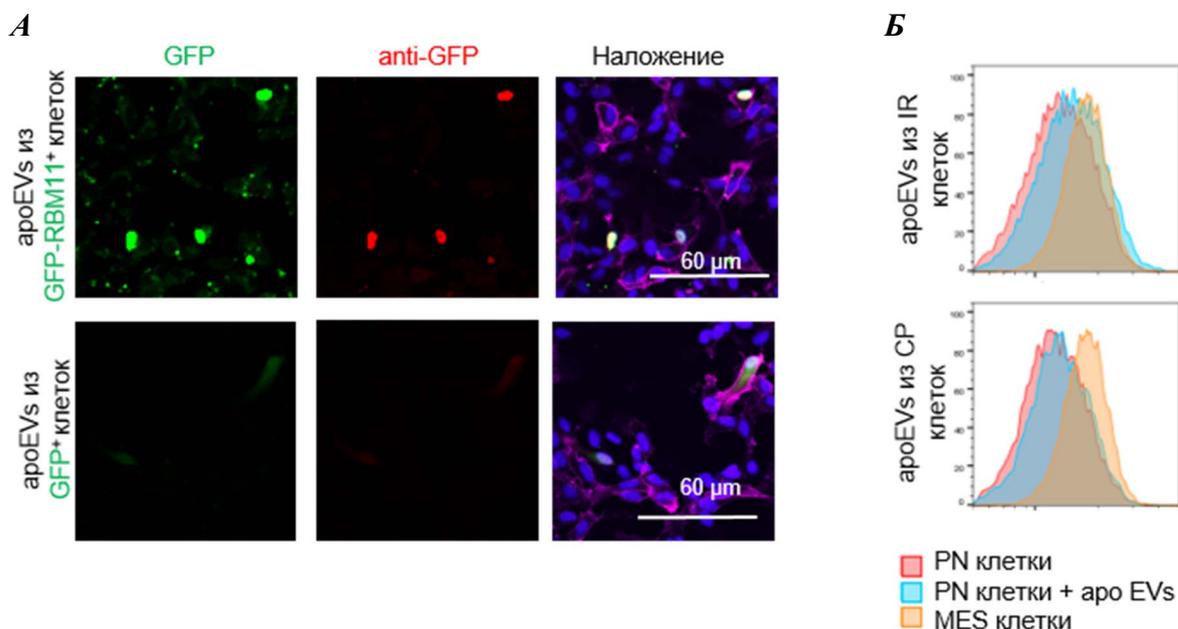


Рисунок 79. А – Флуоресценция GFP, а также окраска антителами на GFP немеченых клеток глиобластомы, к которым были добавлены везикулы, от апоптотических клеток глиобластомы, стабильно экспрессирующих GFP-RBM11 или GFP в качестве контроля. Б – количество белка RBM11, определённое методом проточной цитофлуориметрии, в контрольных пронеурональных клетках глиобластомы и в пронеурональных клетках глиобластомы, к которым были добавлены апоEVs от клеток, обработанных цисплатином (CP) или γ -излучением (IR). Мезенхимальные клетки использовались в качестве положительного контроля.

В заключение мы решили определить путь, по котором RBM11 экспортируется из апоптотических клеток. Для этого линии, стабильно экспрессирующие GFP-RBM11, после индукции апоптоза были окрашены маркером на микровезикулярные тельца (N-Rh-PE [126]) и лизосомы (LysoTracker). Из **рисунка 80** видно, что в погибающих клетках RBM11 колокализуется с N-Rh-PE, но не с лизосомами. Данный результат говорит в пользу того, что после индукции апоптоза RBM11 попадает в микровезикулярные тельца, которые являются родоначальниками экзосом. То есть, в экспорте RBM11 из клеток участвуют экзосом-подобные везикулы.

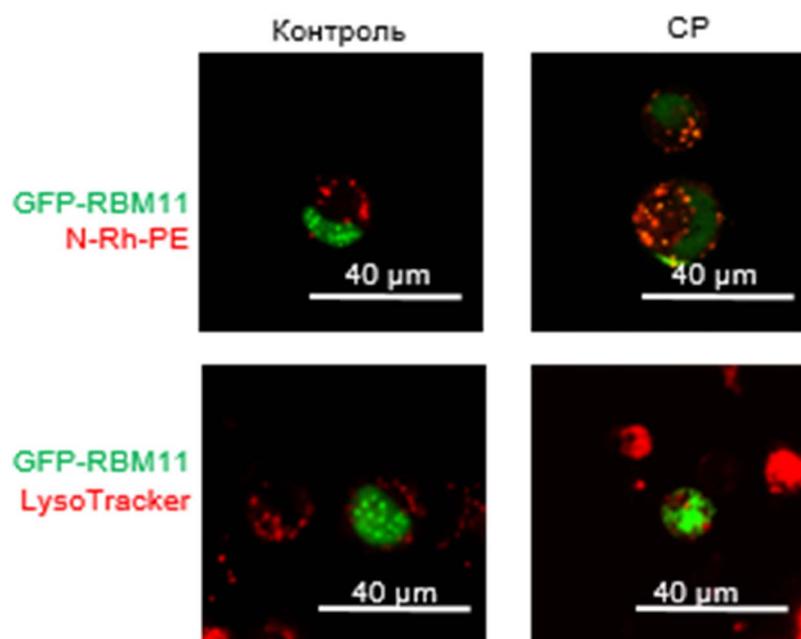


Рисунок 80. Флуоресцентная микрофотография клеток глиобластомы, экспрессирующей GFP-RBM11, и окрашенных N-Rh-PE или LysoTracker через 10 часов после индукции апоптоза цисплатином.

Показав, что RBM11 может транспортироваться в реципиентные клетки с помощью ароEVs, мы решили детально изучать функции этого белка. На момент публикации нашей работы существовала лишь одна статья, описывающая RBM11 [183]. Её авторы продемонстрировали, что этот белок является сплайсинговым фактором и способен связываться с пре-мРНК, однако других данных о RBM11 не было. Чтобы определить роль RBM11 в клетках глиобластомы, мы использовали лентивирусную систему доставки генов. Мы создали пронеурональные клетки глиобластомы с повышенной экспрессией RBM11 и мезенхимальные клетки глиобластомы с нокдауном этого гена. Исследование полученных клеточных линий показало, что повышенная экспрессия RBM11 увеличивает скорость миграции, уровень мезенхимальных маркёров (**Рис. 81А**) и интенсивность аэробного гликолиза (**Рис. 81Б**) в пронеурональных клетках. Напротив, понижение экспрессии RBM11 в мезенхимальных клетках с помощью shRNA приводит к уменьшению уровня мезенхимальных маркёров (**Рис. 81В**), увеличению экспрессии пронеурональных маркёров (**Рис. 81Г**) и, самое главное, к значительному увеличению чувствительности клеток к радиотерапии (**Рис. 81Д**).

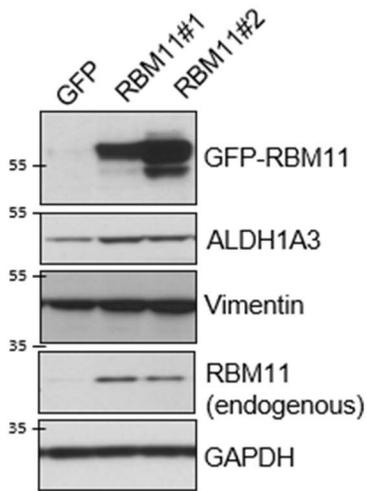
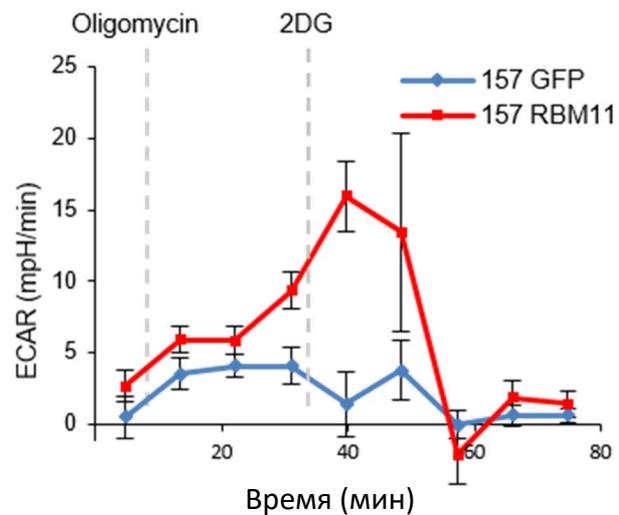
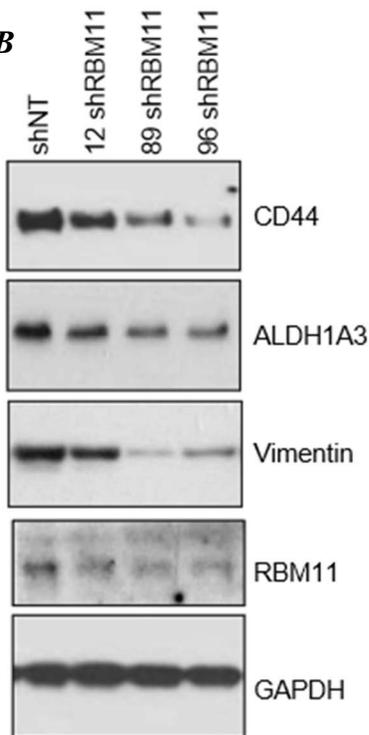
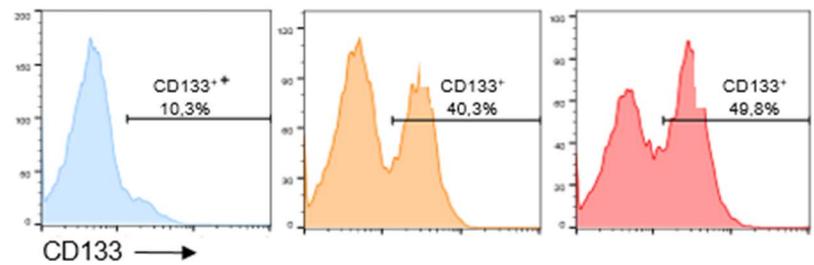
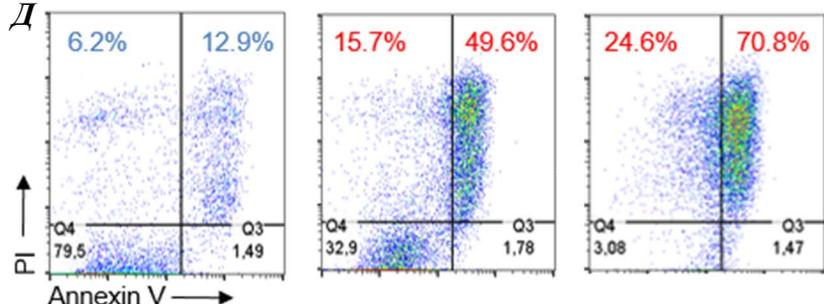
А**Б****В****Г****Д**

Рисунок 81. А – Детекция мезенхимальных маркёров в пронейрональных клетках глиобластомы, экспрессирующих экзогенный GFP или RBM11. Б – Скорость закисления среды (ECAR) пронейрональными клетками глиобластомы, экспрессирующими экзогенный GFP или RBM11. В – Детекция мезенхимальных маркёров в мезенхимальных клетках глиобластомы, экспрессирующих shRNA комплементарную RBM11 или контрольную shRNA. Г – Уровень CD133 (поверхностный маркёр пронейрональных клеток глиобластомы) в мезенхимальных клетках глиобластомы, экспрессирующих shRNA комплементарную RBM11 или контрольную shRNA. Д – Уровень апоптоза после обработки γ -излучением мезенхимальных клеток глиобластомы, экспрессирующих shRNA комплементарную RBM11 или контрольную shRNA.

Анализируя данные, приведённые на **рисунке 81А**, мы сделали неожиданное наблюдение. Оказалось, что экспрессия экзогенного RBM11 (транскрибируемого с вирусного вектора) многократно увеличивает экспрессию эндогенного RBM11 (транскрибируемого с гена этого белка). Изучение литературы показало, что подобный феномен является довольно характерным для сплайсинговых факторов [184, 185]. Дело в том, что часто одной из основных мишеней сплайсосомного белка является его же собственная пре-мРНК. Таким образом клетка создаёт положительные и отрицательные обратные связи, которые позволяют или резко увеличить количество белка при относительно небольшом повышении экспрессии соответствующего гена или, наоборот, при избыточном накоплении данного фактора сплайсинга, он может сам активировать разрушение своей пре-мРНК, что приведёт к снижению количества этого белка.

В качестве первого шага мы решили подтвердить, что повышение экспрессии эндогенного белка RBM11 вызывает именно экзогенный белок RBM11, а не экзогенная мРНК, кодирующая этот белок. Для этого мы создали клеточные линии глиобластомы, стабильно экспрессирующие или одну из двух изоформ RBM11, которые очень похожи друг на друга по аминокислотной последовательности (разница в 7 аминокислот, т.е. 21 нуклеотид), или мРНК RBM11, имеющую делецию нуклеотида около старта-кодона. Такая мРНК почти идентична мРНК, кодирующей белок RBM11 (разница в один нуклеотид), однако из-за сдвига рамки считывания она не способна транслироваться в белок. Далее мы проверили, как экспрессия описанных выше конструкций влияет на экспрессию эндогенного RBM11. Для этого мы использовали метод qRT-PCR и праймеры на 3' не транскрибируемую область RBM11. Этот участок присутствует в мРНК, кодирующей эндогенный белок, но отсутствует в мРНК, транскрибируемой с вирусного вектора и кодирующей экзогенный RBM11. Результаты на **рисунке 82А** убедительно показывают, что экзогенная мРНК RBM11 со сдвигом рамки считывания не способна увеличивать экспрессию эндогенного RBM11, хотя и присутствует в клетках на самом высоком уровне. При этом мРНК, кодирующие различные изоформы RBM11, повышают экспрессию эндогенного RBM11 более чем в 3 раза. На основании этих данных можно предположить, что белок RBM11 способен обеспечивать правильный сплайсинг своей собственной пре-мРНК, что, с одной стороны, повышает количество соответствующего белка и, с другой стороны, защищает мРНК, кодирующую RBM11, от деградации по NMD пути (nonsense mediated decay [186]) и таким образом увеличивает её количество в клетке.

Развивая эту гипотезу, мы выдвинули идею о том, что белок RBM11, попадающий в клетки из ароEVs, способен увеличивать экспрессию эндогенного RBM11 в реципиентных клетках. Такой механизм может, во-первых, существенно амплифицировать сигнал, полученный из везикул, и, во-вторых, закреплять изменения, вызванные ароEVs, в клетках на длительный

срок. Другими словами, возможно, что экзогенный (полученный из ароEVs) RBM11 может увеличивать количество эндогенного RBM11, который в свою очередь будет поддерживать высокую экспрессию самого себя уже после исчезновения ароEVs. Такое предположение могло бы хорошо объяснить данные, полученные нами ранее (**Рис. 75**), о том, что ароEVs индуцируют долгосрочное изменение фенотипа клеток глиобластомы.

Чтобы проверить нашу гипотезу мы исследовали, как ароEVs влияют на экспрессию RBM11 в реципиентных клетках. Из **рисунка 82Б** видно, что уже через 1-3 дня после добавления ароEVs, экспрессия эндогенного RBM11 увеличивается в 2 раза, и эти изменения сохраняются вплоть до 7го дня эксперимента.

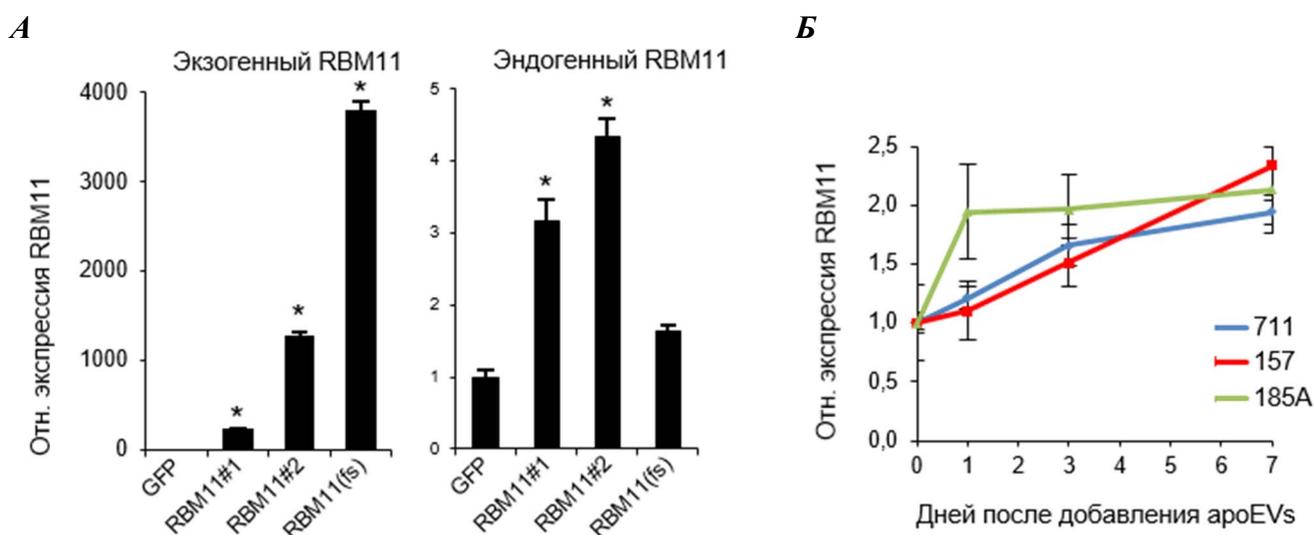


Рисунок 82. А – Экспрессия экзогенного (слева) и эндогенного (справа) RBM11 в клетках глиобластомы, стабильно экспрессирующих GFP, две изоформы RBM11 (NM_144770 (#1) и NM_001320602 (#2)) и мРНК RBM11, имеющую сдвиг рамки считывания (RBM11(fs)). Б – Экспрессия RBM11 в трёх первичных культурах пронейрональных клеток глиобластомы через различные промежутки времени после добавления к ним ароEVs.

Получив столь интересные данные о регуляции экспрессии RBM11, мы углубились в изучение молекулярного механизма действия этого белка на клетки глиобластомы. В первую очередь мы определили уровни экспрессии генов в пронейрональных клетках глиобластомы с повышенной экспрессией RBM11 и в мезенхимальных клетках глиобластомы с нокадаунм этого гена. Использование метода микрочипов и последующий биоинформатический анализ данных методом GSEA (Gene Set Enrichment Analysis) показали, что повышение экспрессии RBM11

приводит к активации перехода G1/S фаз клеточного цикла (**Рис. 83 слева**), а понижение экспрессии приводит к активации клеточной гибели (**Рис. 83 справа**).

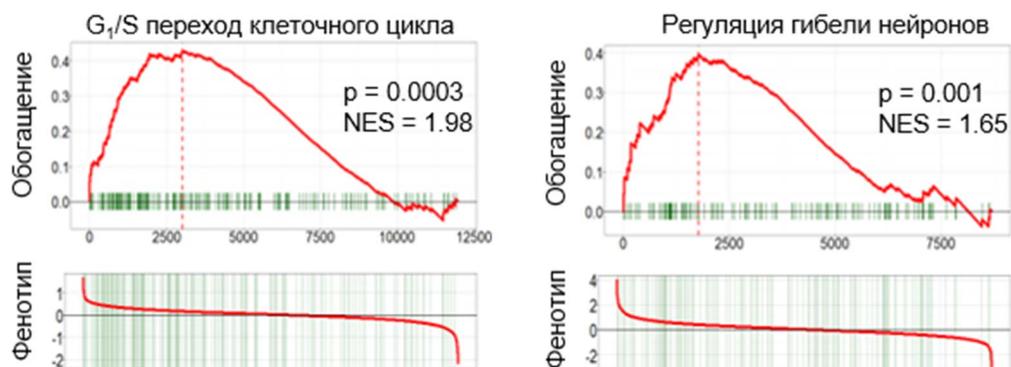


Рисунок 83. GSEA анализ данных экспрессии генов в пронеурональных клетках глиобластомы, стабильно экспрессирующих GFP или GFP-RBM11 (слева) и в мезенхимальных клетках глиобластомы, экспрессирующих shRNA комплементарную RBM11 или контрольную shRNA (справа).

Далее мы использовали метод РНК иммунопреципитации (RIP) чтобы определить молекулы РНК, с которыми может взаимодействовать белок RBM11, и сплайсинг которых он регулирует. Как и ожидалось, мы показали, что RBM11 образует комплексы с некодирующими уридин богатыми РНК сплайсосомы (U1, U11 и U5) и не связывается с 18S рРНК и мРНК, кодирующей GAPDH (**Рис. 84А**). Такой результат подтверждает, что белок RBM11 может взаимодействовать со сплайсосомой и значит напрямую вовлечён в регуляцию сплайсинга пре-мРНК. Также, согласно нашим данным, RBM11 связывается со своей собственной мРНК (**Рис. 84А и 84Б**). Это является важным подтверждением гипотезы, изложенной выше, о том, что RBM11 способен регулировать свою экспрессию. В дополнение к этому, наш эксперимент продемонстрировал взаимодействие RBM11 с мРНК, кодирующими белки MDM4 и Циклин D1 (**Рис. 84А и 84В**). Мы подтвердили эти данные с помощью RIP и последующего ПЦР анализа (**Рис. 84Г**).

Основываясь на таком результате, мы предположили, что RBM11 может регулировать сплайсинг MDM4 и Циклина D1. MDM4 имеет 2 хорошо описанных изоформы: MDM4s (короткая) и MDM4f (полноразмерная) [187]. Было показано, что короткая изоформа является сильным онкогеном, защищает клетки от апоптоза и более чем в 10 раз ускоряет деградацию белка p53. Белок Циклин D1 также имеет две изоформы: Циклин D1a и Циклин D1b [188]. Их функции не до конца понятны, однако известно, что Циклин D1a, в отличие от Циклин D1b, активирует систему чекпоинта клеточного цикла и способствует репарации ДНК.

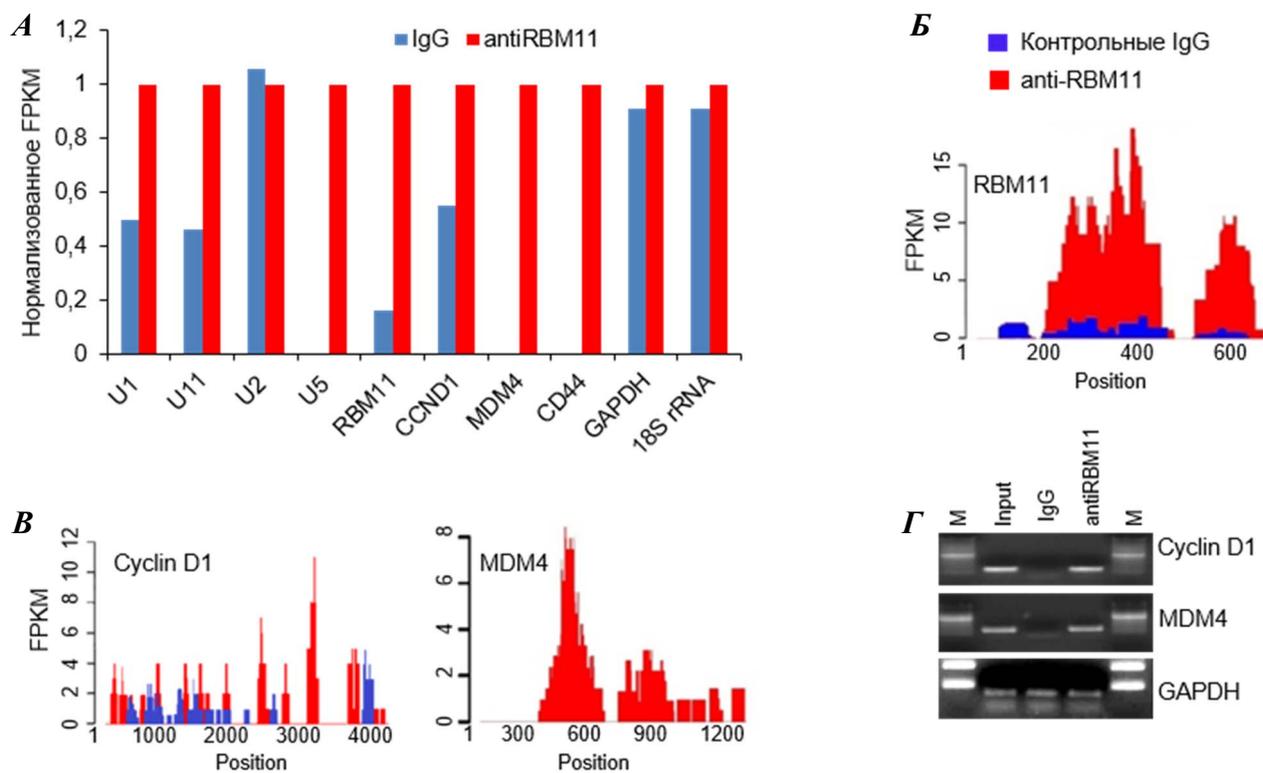


Рисунок 84. А – РНК иммунопреципитация с антителами против RBM11 или контрольными антителами и последующее глубокое секвенирование элюированных молекул РНК. Данные демонстрируют относительное обогащение U1, U11, U5 уридин богатых некодирующих РНК, а также мРНК, кодирующих RBM11, CyclinD1 и MDM4 в образце, преципитированном с антителами против RBM11. 18S рРНК и GAPDH мРНК показаны в качестве контроля. Б и В- Профиль обогащения молекул РНК, преципитируемых с антителами против RBM11 (красный) или контрольными антителами (синий), полученный с помощью RIP-seq для генов RBM11, Cyclin D1 и MDM4. Г – Подтверждение данных RIP-seq с помощью ПЦР.

Сравнив экспрессию изоформ MDM4 и Циклина D1 в пронеурональных и мезенхимальных клетках глиобластомы, мы обнаружили, что мезенхимальные клетки экспрессируют повышенное количество более онкогенных изоформ MDM4s и Циклин D1a (**Рис. 85А**). Не удивительно, что обработка пронеурональных клеток ароEVs способствовала сдвигу равновесия сплайсинга в сторону продукции мезенхимальных MDM4s и Циклин D1a (**Рис. 85Б**). В заключение мы исследовали, как изменение количества RBM11 повлияет на содержание этих изоформ в клетке. Наши результаты показали, что увеличение экспрессии RBM11 приводит к сдвигу сплайсинга в сторону продукции мезенхимальных изоформ MDM4s и Циклин D1a, а понижение экспрессии RBM11, напротив, смещает равновесие в сторону синтеза пронеурональных изоформ MDM4f и Циклин D1b (**Рис. 85Б**).

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

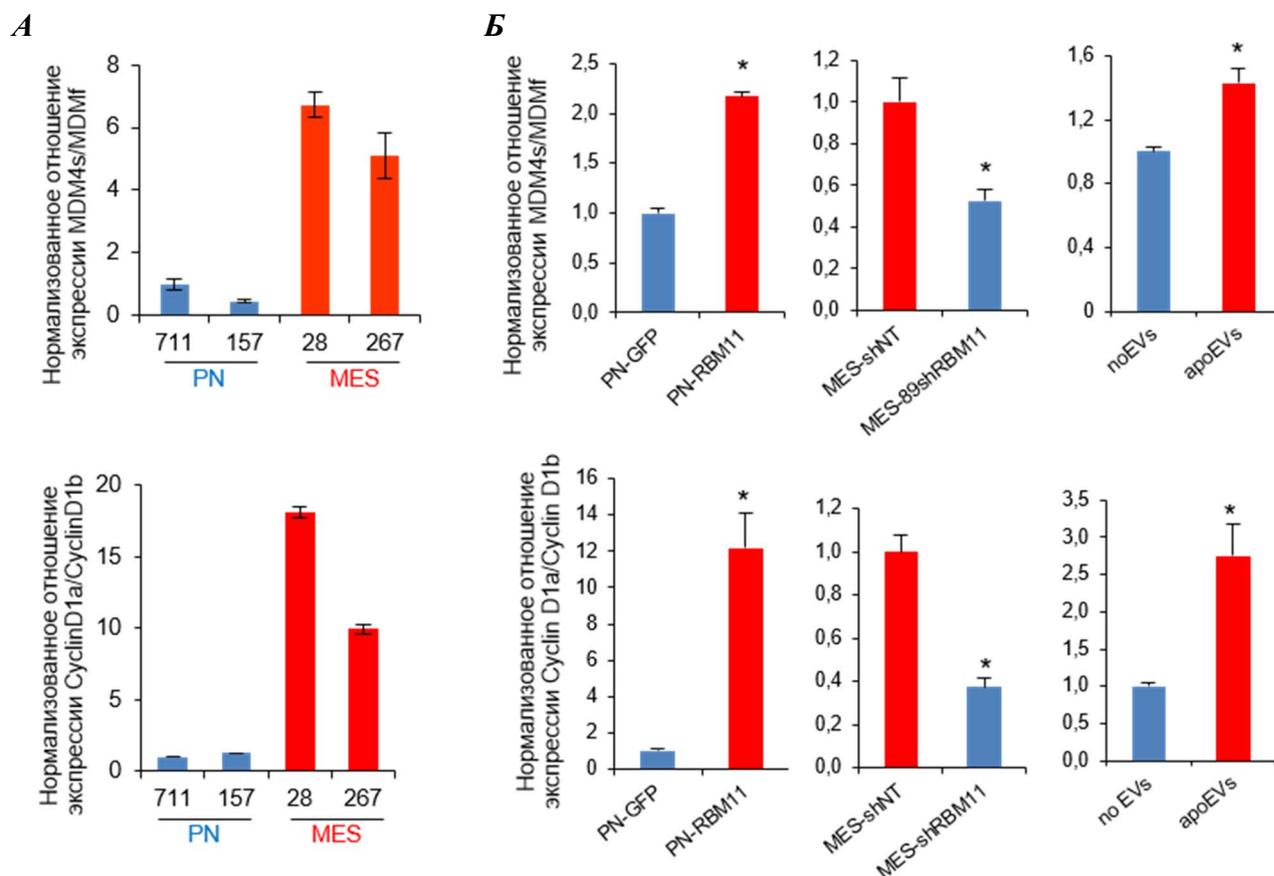


Рисунок 85. А – Анализ экспрессии различных изоформ *CyclinD1* и *MDM4* методом *qRT-PCR* в пронеурональных и мезенхимальных первичных культурах глиобластомы. Б – Анализ экспрессии различных изоформ *CyclinD1* и *MDM4* методом *qRT-PCR* в пронеурональных клетках глиобластомы с повышенной экспрессией *RBM11* и в мезенхимальных клетках глиобластомы с нокдауном этого гена, а также в пронеурональных клетках глиобластомы, преинкубированных с *apoEVs*.

Чтобы определить какое влияние переключение сплайсинга MDM4 и Циклина D1 оказывает на опухоли пациентов, мы проанализировали базу данных TCGA. Из **рисунка 86** видно, что сдвиг сплайсинга в сторону продукции MDM4s и Циклина D1a коррелирует с плохим прогнозом для больных с глиобластомой. Таким образом, можно утверждать, что RBM11, действуя через MDM4 и Циклин D1, способствует приобретению опухолями мозга более агрессивного фенотипа.

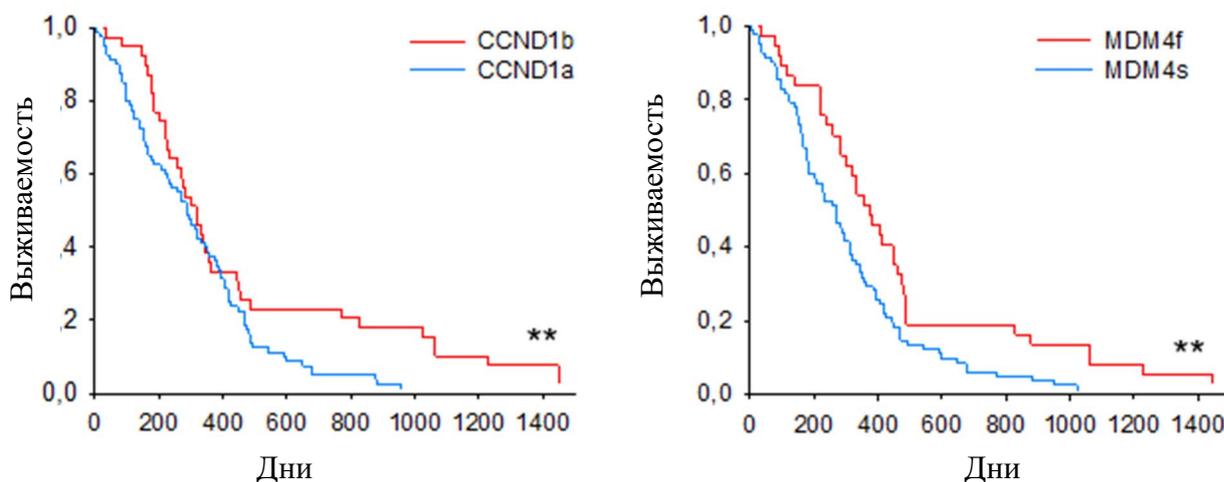


Рисунок 86. Кривые Каплан-Майера, показывающие выживаемость пациентов с глиобластомой, разделённых на 2 группы на основании сплайсинга Циклина D1 (CCND1; слева) и MDM4 (справа), данные получены из базы данных TCGA. $p = 0.0392$ и $p = 0.0112$ для Циклина D1 и MDM4 соответственно.

Получив информацию о функциях RBM11 в клетках глиобластомы, мы постарались определить влияние экзогенного RBM11, поступающего в клетки из ароEVs. С этой целью мы решили доказать, что нокдаун сплайсосомных белков в клетках-донорах везикул приведёт к ослаблению эффекта ароEVs на реципиентные клетки. В первую очередь мы сравнили действие ароEVs, секретированных пронейрональными клетками глиобластомы с нокдауном RBM11 и с оверэкспрессией RBM11, на реципиентные клетки, полученные от того же пациента *in vitro*. Из **рисунка 87А** видно, что нокдаун RBM11 в клетках-донорах везикул, понижает эффект ароEVs на реципиентные клетки, в то время как оверэкспрессия RBM11 в клетках-донорах везикул, напротив, увеличивает эффективность действия ароEVs. В данном эксперименте разница в эффекте ароEVs, полученных из различных источников, была не столь значительна, хотя и статистически достоверна, поэтому далее мы приступили к опытам *in vivo*.

В экспериментах с животными кроме RBM11 в качестве мишени для нокдауна нами также был выбран белок PRPF8, который является одним из основных коровых компонентов сплайсосомы и критически важен для сборки и функционирования всего сплайсосомного комплекса [189]. Первым шагом мы получили клетки глиобластомы с пониженной экспрессией RBM11, PRPF8 или обоих белков сразу. Далее эти клетки использовались для двух различных экспериментов. В первом эксперименте мы сравнили эффект ароEVs, произведённых контрольными донорными клетками и донорными клетками с нокдауном RBM11. Для этого трём группам животных были трансплантированы клетки глиобластомы вместе с ароEVs,

секретированными контрольными апоптотическими клетками (1) или апоптотическими клетками с нокаутом RBM11 (2 и 3; для нокаута RBM11 использовались две различных последовательности shRNA). Кривая Каплана-Мейера на **рисунке 87Б** демонстрирует, что нокаут RBM11 в клетках-донорах apoEVs существенно снижает скорость роста опухоли, сформированной реципиентными клетками. Во втором эксперименте мы определили эффект апоптотических клеток с нокаутом RBM11 и PRPF8 на пролиферацию «здоровых» клеток глиобластомы. Для этого четырем группам животных, трансплантировали смесь «здоровых» меченных люциферазой клеток глиобластомы и немеченных апоптотических клеток с нокаутом RBM11 (1), PRPF8 (2), обоих белков сразу (3) или контрольных апоптотических клеток без нокаута (4). Для индукции апоптоза немеченные клетки перед трансплантацией были облучены летальной дозой γ -излучения. Из **рисунков 87В** и **87Г** видно, что нокаут RBM11 и PRPF8 в апоптотических клетках существенно замедляет рост «здоровых» опухолевых клеток, а нокаут обоих белков одновременно ведёт к ещё более заметному снижению про-пролиферативного эффекта апоптотических клеток.

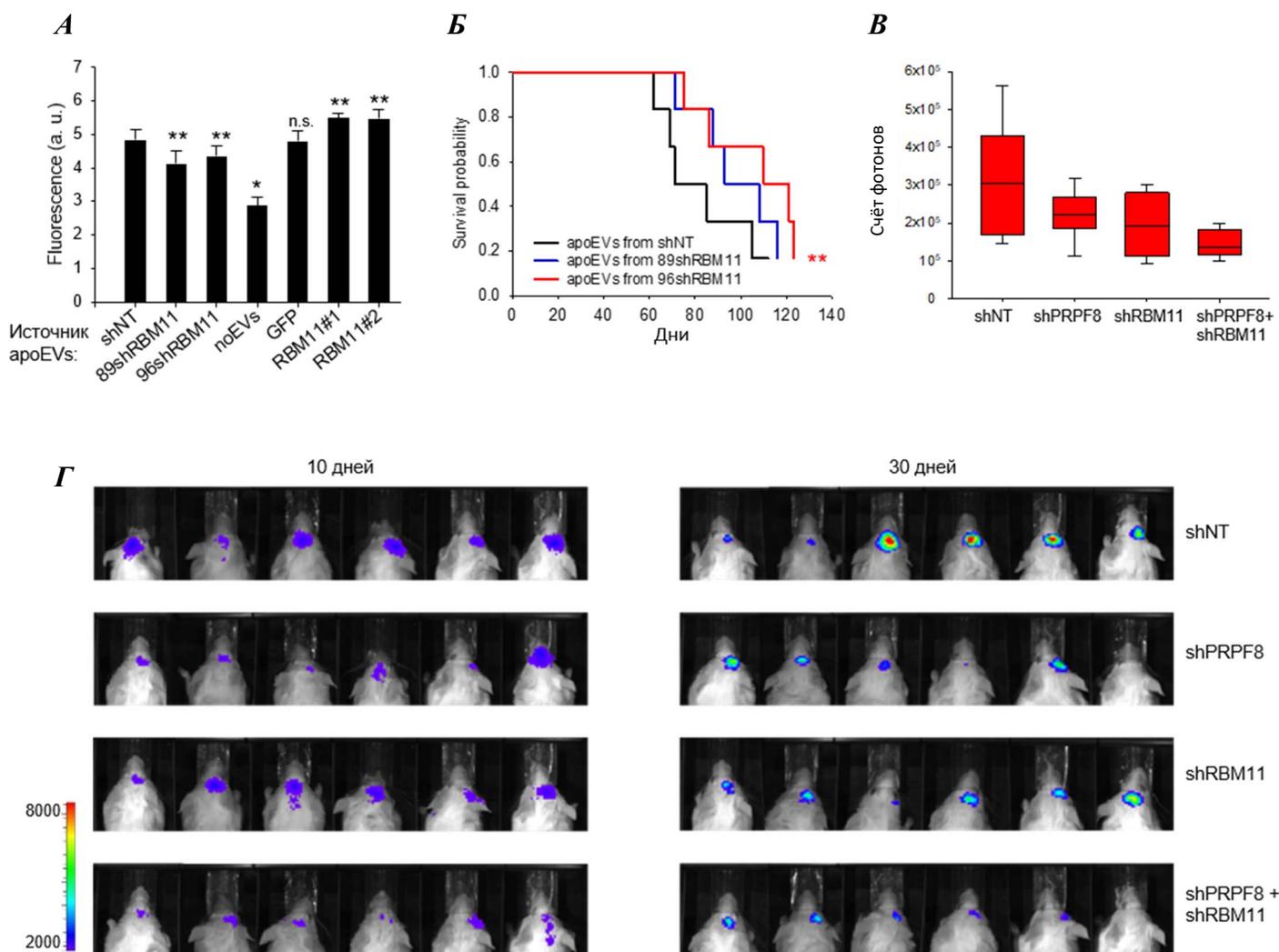


Рисунок 87. А – Относительное количество клеток, культивируемых в течение 7 дней в среде без везикул (по EVs) или с везикулами из различных источников: *shNT* – клетки-доноры везикул экспрессировали контрольную последовательность *shRNA*; *89shRBM11* и *96shRBM11* – клетки-доноры везикул экспрессировали *shRNA* комплементарную *RBM11* (две различных последовательности); *GFP* – клетки-доноры везикул экспрессировали *GFP*; *RBM11#1* и *RBM11#2* – клетки-доноры везикул оверэкспрессировали *RBM11* (две различные изоформы). Б - Кривая Каплана-Мейера, демонстрирующая выживаемость мышей, в мозг которых были трансплантированы клетки глиобластомы человека вместе с везикулами, секретируемыми апоптотическими клетками глиобластомы, которые ранее были заражены лентивирусами, кодирующими контрольную *shRNA* (*shRNA*) или *shRNA*, комплементарную *RBM11* (*89shRBM11* или *96shRBM11*); $p = 0.13$ и $p=0.04$ соответственно. В - Количественная оценка биолуминисценции в мозге иммунодефицитных мышей, которым были трансплантированы «здоровые» меченные люциферазой клетки глиобластомы человека вместе с апоптотическими немечеными клетками глиобластомы, которые ранее были заражены лентивирусами, кодирующими контрольную *shRNA* (*shRNA*) или *shRNA*, комплементарную *RBM11* (*shRBM11*) и/или *PRPF8* (*shPRPF8*). Г - Репрезентативные изображения биолуминисценции в мозге соответствующих мышей через различные промежутки времени после инъекции клеток.

Все результаты, перечисленные выше (**Рис. 87**), говорят о том, что *RBM11* действительно ответственен, по крайней мере, частично, за эффект ароEVs на реципиентные клетки глиобластомы. Другими словами, влияние ароEVs на реципиентные клетки (ускорение пролиферации и миграции, изменение типа метаболизма, увеличение экспрессии мезенхимальных маркёров, повышенная устойчивость к терапии) обусловлено множеством факторов, часть из которых может не иметь прямого отношения к регуляции сплайсинга пре-мРНК, однако сплайсосомы, передаваемые реципиентным клеткам с помощью ароEVs, и в особенности белок *RBM11*, вносят весомый вклад в эффективность действия ароEVs на реципиентные клетки глиобластомы *in vitro* и *in vivo*.

В заключение мы решили подтвердить клиническую значимость, полученных нами результатов. Для этого мы окрасили антителами на *RBM11* срезы глиобластомы, полученные от более чем 100 различных пациентов, в том числе и парные образцы от одного и того же больного до и после терапии. Из **рисунка 88А** видно, что повышенная экспрессия *RBM11* коррелирует с более плохой выживаемостью пациентов, а, следовательно, и с более агрессивным фенотипом опухоли. Кроме того, анализ парных образцов подтвердил, что терапия (γ-излучение и TMZ) действительно вызывает увеличение количества *RBM11* у большинства пациентов (**Рис. 88Б**).

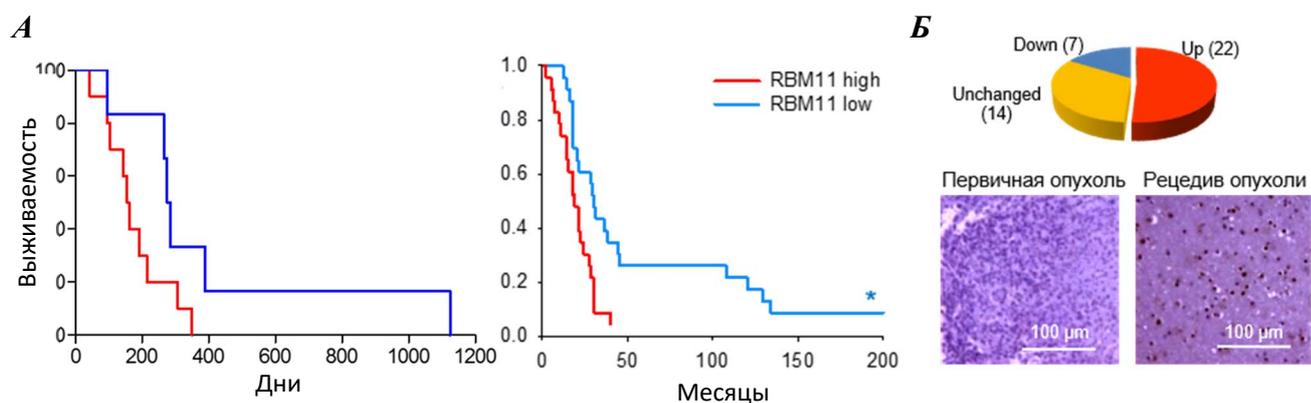


Рисунок 88. А – Кривая Каплан-Майера, показывающая выживаемость пациентов с глиобластомой, разделённых на 2 группы на основании интенсивности окрашивания опухолей антителами на RBM11. В эксперименте использовалось два набора образцов и два различных антитела к белку RBM11 (HPA045885 и ab173589). $p = 0.0767$ и $p = 0.0018$ соответственно. Б – Анализ интенсивности иммуногистохимического окрашивания антителами на RBM11 (HPA045885) 43х пар срезов глиобластом, полученных до и после лечения пациентов. Нижняя панель показывает репрезентативное окрашивание первичных и рецидивирующих опухолей.

Суммируя все результаты, полученные при исследовании роли апоптотических клеток в прогрессии глиобластомы, нами была предположена следующая модель: терапия или недостаток питательных веществ, возникающий вследствие роста опухоли, вызывает появление большой популяции апоптотических клеток. В процессе апоптоза гибнущие клетки экспрессируют факторы сплайсинга, характерные для более агрессивного мезенхимального фенотипа глиобластомы. Эти сплайсосомные белки перемещаются из ядра в цитоплазму, где инкапсулируются внутрь мембранных пузырьков (везикул), которые транспортируют их в выжившие реципиентные клетки. Оказавшись в реципиентной клетке, сплайсосомные белки из везикул перемещаются в ядро, где меняют тип сплайсинга пре-мРНК в сторону продукции более онкогенных белковых изоформ. Все это увеличивает устойчивость реципиентных клеток к терапии, изменяет тип их метаболизма, ускоряет миграцию и, в конечном итоге, способствует приобретению ими более агрессивного мезенхимального фенотипа (**Рис. 89**). Мы продемонстрировали весь этот механизм для одного, выбранного нами фактора сплайсинга RBM11, однако есть все основания утверждать, что и другие белки сплайсосомы могут вносить весомый вклад в действие ароEVs на реципиентные клетки. Кроме того, поскольку сходные результаты были получены нами и для аденокарциномы яичников, то можно предположить, что феномен транспорта сплайсосом между раковыми клетками является общим свойством для всех или большинства типов солидных опухолей [190-192].

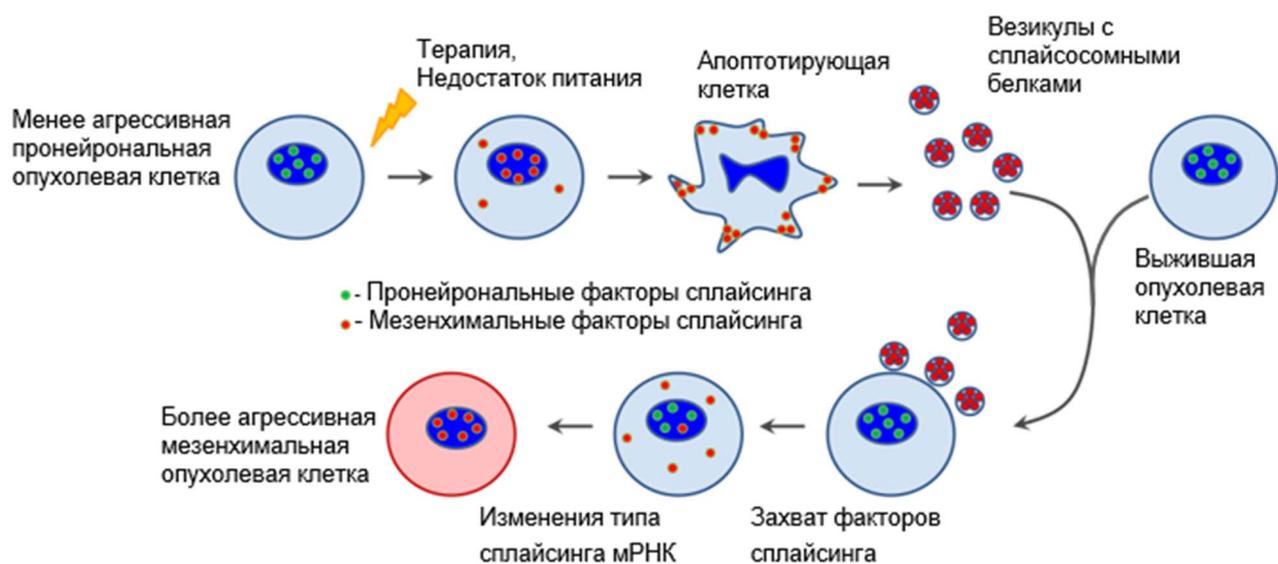


Рисунок 89. Модель, иллюстрирующая предполагаемую роль сплайсосомных белков в передаче сигнала от апоптотических к выжившим клеткам глиобластомы.

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

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

Отличительной чертой глиобластом является необычайная степень внутриопухолевой гетерогенности, которая отчасти возникает вследствие иерархической организации клеток. Не вдаваясь в подробности, можно сказать, что существуют более агрессивные и устойчивые к терапии стволовые клетки глиобластомы (GSC) и менее агрессивные частично дифференцированные клетки [193]. С другой стороны, разделяют более агрессивные

мезенхимальные и менее агрессивные пронеурональные клетки, о которых упоминалось выше [110]. Целью экспериментов, описанных далее, стало создание препаратов для направленного уничтожения стволовых клеток глиобластомы, а также мезенхимальных клеток глиобластомы.

4.3.1. Создание низкомолекулярного ингибитора киназы NEK2.

Данные, приведённые выше, свидетельствуют о том, что регуляция сплайсинга имеет ключевое значение для приобретения и поддержания агрессивного фенотипа клеток глиобластомы. К сожалению, лишь в редких случаях ингибиторы не обладающих энзиматической активностью белков, к которым относится RBM11, оказываются достаточно специфичны и эффективны для использования в клинической практике. По этой причине мы приняли решение создать низкомолекулярный ингибитор фермента, регулирующего сплайсинг пре-мРНК в опухолевых клетках. Наиболее удобными мишенями для подобных ингибиторов являются киназы, в силу уникальной структуры своих активных центров и, в большинстве случаев, высокой субстратной специфичности [194].

Анализ экспрессии генов методом микрочипов в нормальных человеческих астроцитах, дифференцированных клетках глиобластомы и в культурах, обогащённых GSC, показал, что среди всех 518ти киназ киназа NEK2 наиболее специфично экспрессируется в стволовых клетках глиобластомы и не экспрессируется в более дифференцированных нормальных и опухолевых клетках (**Рис. 90А**). Мы подтвердили этот результат с помощью сортировки клеток, окрашенных на CD133 (маркёр пронеурональных стволовых клеток глиобластомы) и ALDEFUOR (маркёр мезенхимальных стволовых клеток глиобластомы), и последующего анализа экспрессии генов методом qRT-PCR. Из **рисунка 90Б** видно, что стволовые клетки глиобластомы обоих фенотипов экспрессируют киназу NEK2 на гораздо более высоком уровне, чем не стволовые, частично дифференцированные клетки. Чтобы дополнительно подтвердить эти данные, мы культивировали клетки глиобластомы, полученные от одного и того же пациента, в условиях, увеличивающих содержание стволовых клеток, и в условиях, вызывающих дифференцировку (Среда IV и Среда II соответственно; см. пункты 2.3.1 и 3.1.6; [195]). Из **рисунка 90В** видно, что для культур, обогащённых GSC, характерно повышенное количество NEK2, тогда как для дифференцированных клеток, наоборот, пониженное. Таким образом, NEK2 действительно специфично экспрессируется в стволовых клетках глиобластомы. Удивительно, но дальнейший анализ литературы показал, что киназа NEK2 играет ключевую роль в регуляции сплайсинга пре-мРНК, так как может фосфорилировать множество сплайсосомных белков [196]. Тот факт, что среди всех 518ти известных киназ наиболее специфичной для GSC оказалась именно киназа - регулятор сплайсинга подчёркивает особую важность процесса сплайсинга для глиобластом.

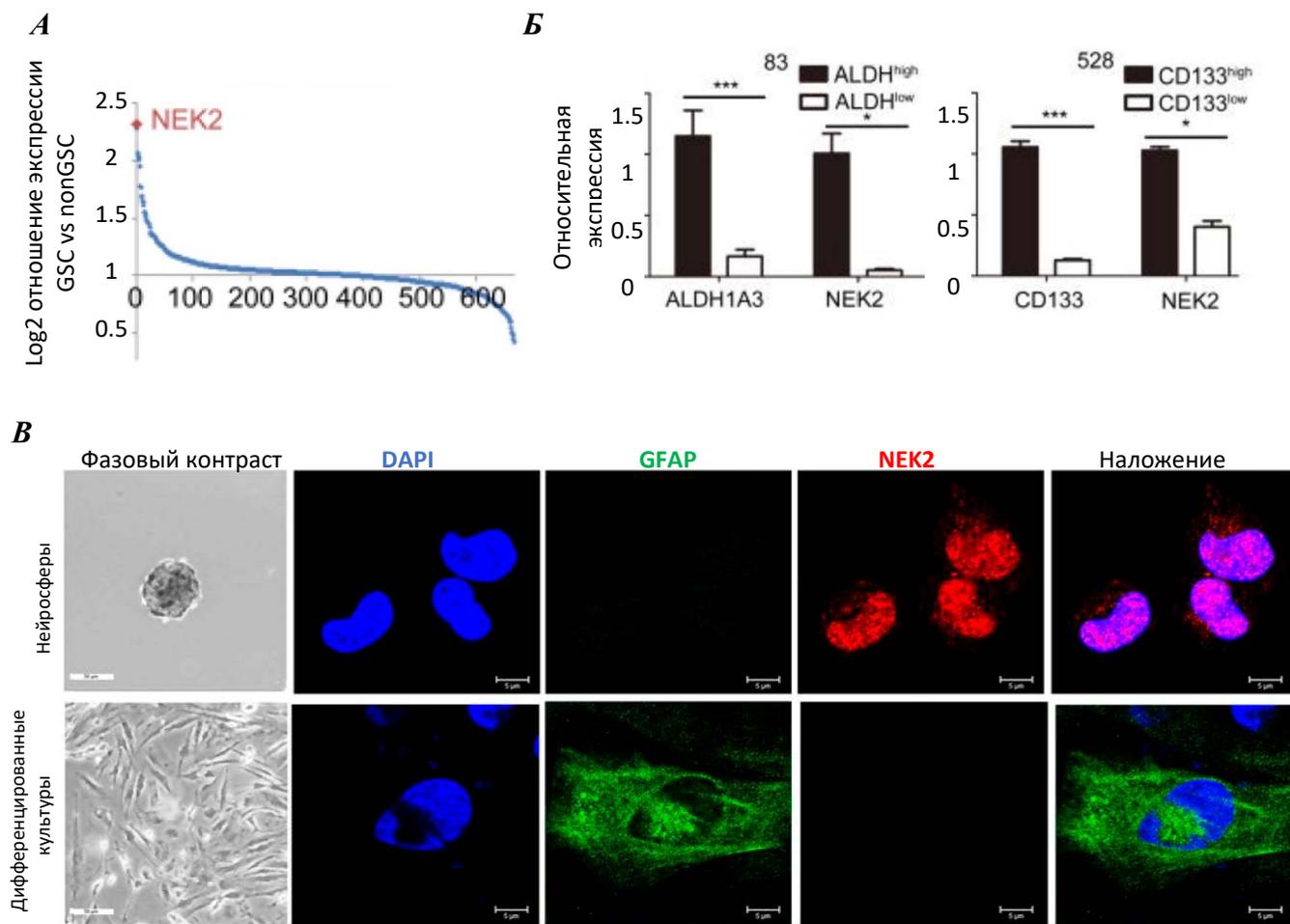


Рисунок 90. А – Относительная экспрессия генов, кодирующих киназы, в стволовых клетках глиобластомы и нормальных человеческих астроцитах. Б – Экспрессия NEK2, CD133 (маркёр пронеурональных стволовых клеток) и ALDH1A3 (маркёр мезенхимальных стволовых клеток) в мезенхимальных клетках глиобластомы, рассортированных по уровню окраски ALDEFLUOR (слева) и в пронеурональных клетках глиобластомы, рассортированных по уровню окраски на CD133 (справа). В – Фотографии в фазовом контрасте и флуоресцентные микрофотографии клеток глиобластомы, выращиваемых в течение месяца в среде IV (растут в виде нейросфер) или в среде II (растут в виде монослоя), и окрашенных антителами к GFPA (зелёный; маркёр дифференцированных клеток глиобластомы [197]), NEK2 (красный) и красителем DAPI (синий).

Далее мы исследовали, существует ли связь между экспрессией NEK2 и выживаемостью пациентов с глиобластомой. Окрасив образцы опухолей, собранные от 44х пациентов, антителами к NEK2 и сравнив полученные данные со сроком жизни больных, мы показали, что высокая экспрессия NEK2 коррелирует с плохим прогнозом для выживаемости пациентов (**Рис. 91А**). Мы подтвердили эти результаты с помощью биоинформатического анализа базы данных TCGA (**Рис. 91Б**). Таким образом, NEK2 действительно связана с более агрессивным поведением опухоли.

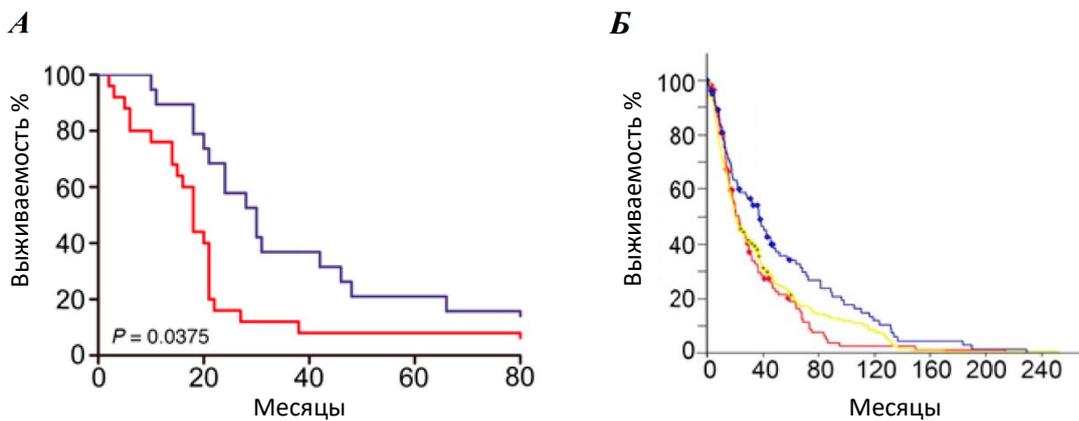


Рисунок 91. А – Кривая Каплан-Майера, показывающая выживаемость пациентов с глиобластомой, разделённых на 2 группы на основании интенсивности окрашивания опухолей антителами на NEK2 ($p = 0.0375$). Б – Кривые Каплан-Майера, показывающая выживаемость пациентов с глиобластомой, разделённых на 3 группы на основании экспрессии NEK2 ($p = 0.004$); результаты получены с помощью биоинформатического анализа базы данных TCGA. Выживаемость пациентов с высокой экспрессией NEK2 показана красной линией, со средней экспрессией жёлтой и с низкой экспрессией – синей.

Чтобы окончательно убедиться в том, что NEK2 действительно является перспективной мишенью для терапии глиобластомы, мы исследовали влияние нокдауна этого белка на опухолевые клетки. Из полученных результатов видно, что понижение экспрессии NEK2 замедляет пролиферацию *in vitro* (Рис. 92А), уменьшает способность единичных клеток образовывать нейросферы, что свидетельствует об уменьшении содержания GSC в культуре глиобластомы (Рис. 92Б) [198] и, наконец, почти полностью останавливает рост опухолей в иммунодефицитных мышах *in vivo* (Рис. 92В).

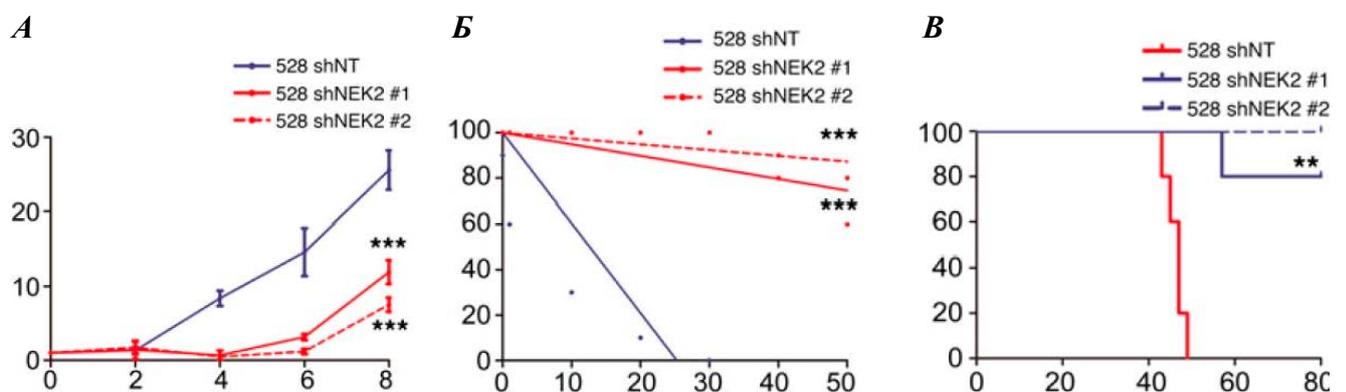


Рисунок 92. А – Скорость роста первичной культуры клеток глиобластомы, экспрессирующей *shRNA* комплементарную *NEK2* (две различных последовательности #1 и #2) или контрольную *shRNA* (*shNT*). Б – Анализ частоты формирования нейросфер в первичной культуре клеток глиобластомы, экспрессирующей *shRNA* комплементарную *NEK2* или контрольную *shRNA*. В – Кривая Каплана-Мейера, демонстрирующая выживаемость мышей, в мозг которых были трансплантированы клетки глиобластомы, экспрессирующие *shRNA* комплементарную *NEK2* или контрольную.

Исходя из всех фактов, перечисленных выше, мы выбрали *NEK2* как мишень для создания нового низкомолекулярного ингибитора.

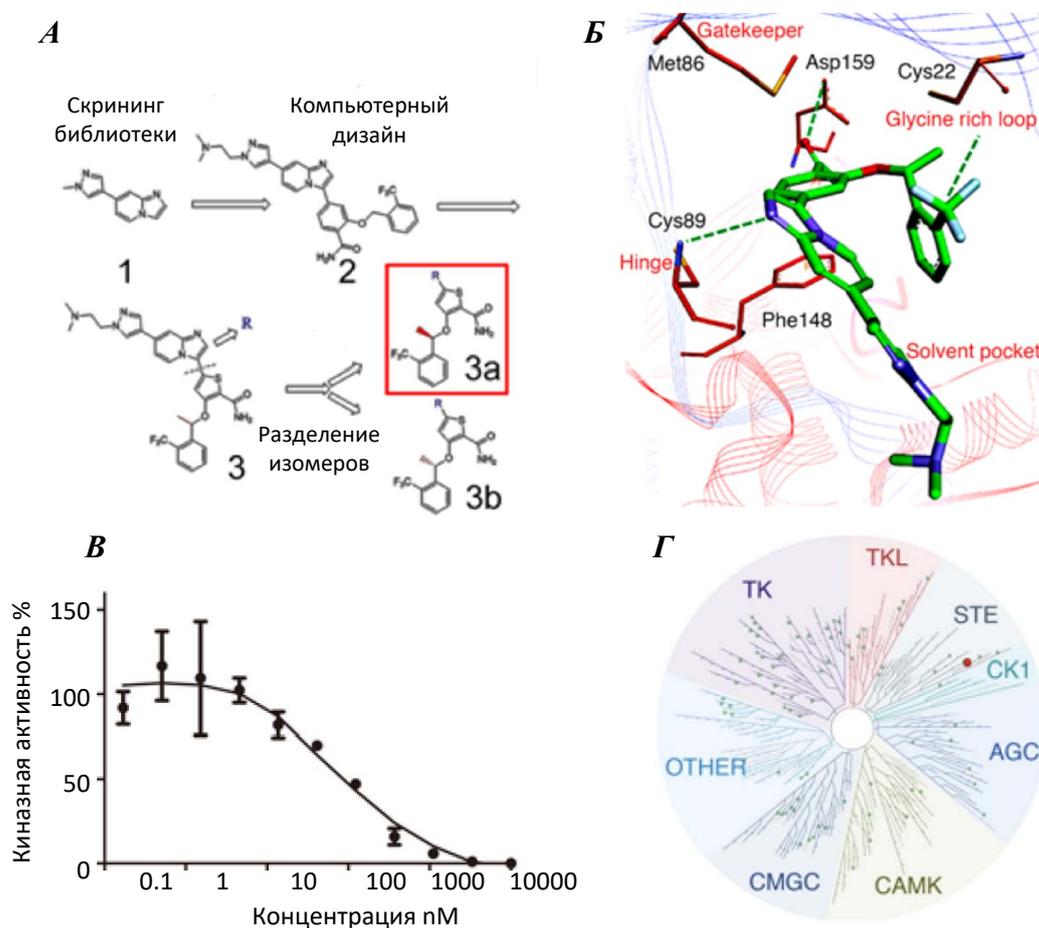


Рисунок 93. А – Стратегия создания низкомолекулярного ингибитора киназы *NEK2*. Б - Рассчитанная структура ингибитора *NEK2*, взаимодействующего с активным центром этой киназы. В - Относительная киназная активность *NEK2* при инкубации с различными концентрациями ингибитора. Г – Эффект низкомолекулярного ингибитора *NEK2* на активность 97ми киназ. Размер точки пропорционален эффективности ингибирования.

Скрининг библиотеки из 300 ингибиторов киназ позволил определить соединение (1) как потенциальный ингибитор NEK2 с $IC_{50} \approx 20 \mu M$ (Рис. 93А). Последующий компьютерный дизайн предсказал структуру (2) как более эффективный ингибитор. Соединение (2) было синтезировано и действительно показало улучшенную способность к ингибированию NEK2 ($IC_{50} \approx 0.1 \mu M$). Последующая химическая модификация позволила создать соединение (3), обладающее $IC_{50} \approx 0.03 \mu M$. Соединение (3) представляло собой смесь энантиомеров. При разделении этой смеси были получены ингибиторы (3a) с $IC_{50} \approx 0.015 \mu M$ и (3b) с $IC_{50} \approx 0.2 \mu M$. Соединение (3a: 5-[7-{1-[2-(диметиламино)этил]-1H-пиразол-4-ил}имидазо[1,2-a]пиридин-3-ил]-3-{(1R)-1-[2-(трифторметил)фенил]этокси}тиофен-2-карбоксамид) было названо СМР3а и использовано для дальнейших экспериментов (Рис. 93Б). В первую очередь мы подтвердили способность СМР3а ингибировать киназную активность NEK2 при различных концентрациях (Рис. 93В). Затем мы исследовали селективность действия СМР3а. Проверив действие этого соединения на 97 киназ, принадлежащих к различным семействам, мы показали, что СМР3а специфично ингибирует только NEK2, но не другие киназы (Рис. 93Г).

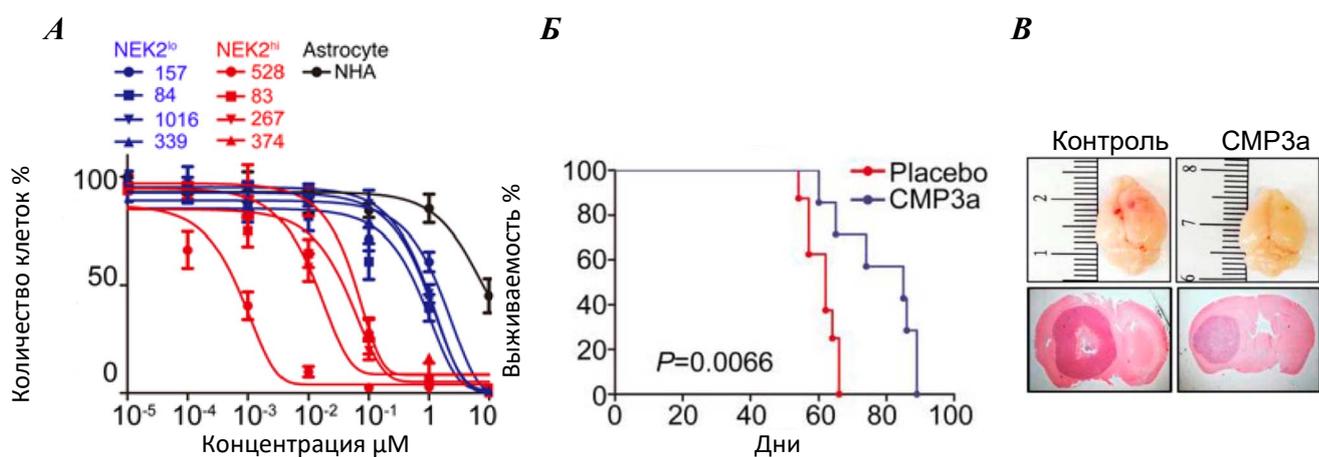


Рисунок 94. А – Влияние ингибитора NEK2 на жизнеспособность нормальных человеческих астроцитов (NHA) и клеток глиобластомы, полученных от восьми различных пациентов. Клетки разделены на две группы: экспрессирующие NEK2 на высоком (красный) и низком (синий) уровнях. Б - Кривая Каплана-Мейера, демонстрирующая выживаемость мышей, в мозг которых были трансплантированы клетки глиобластомы человека, после чего мышам через хвостовую вену в течение 10 дней вводили ингибитор NEK2 (СМР3а) или растворитель. В - Окрашенные гематоксилином и эозином срезы мозга мышей, которым были трансплантированы клетки глиобластомы человека. Через 2 недели после трансплантации мышам через хвостовую вену в течение 10 дней вводили ингибитор NEK2 или растворитель.

Далее мы показали, что СМР3а способен в наномолярных концентрациях вызывать гибель культур, обогащённых стволовыми клетками глиобластомы, и более чем на два порядка слабее действует на дифференцированные клетки глиобластомы и нормальные человеческие астроциты (Рис. 94А). В заключение мы исследовали действие СМР3а *in vivo*. Как видно из рисунков 94Б и 94В, введение раствора ингибитора НЕК2 через хвостовую вену значительно увеличивает выживаемость животных и замедляет рост интракраниальных опухолей, трансплантированных иммунодефицитным мышам.

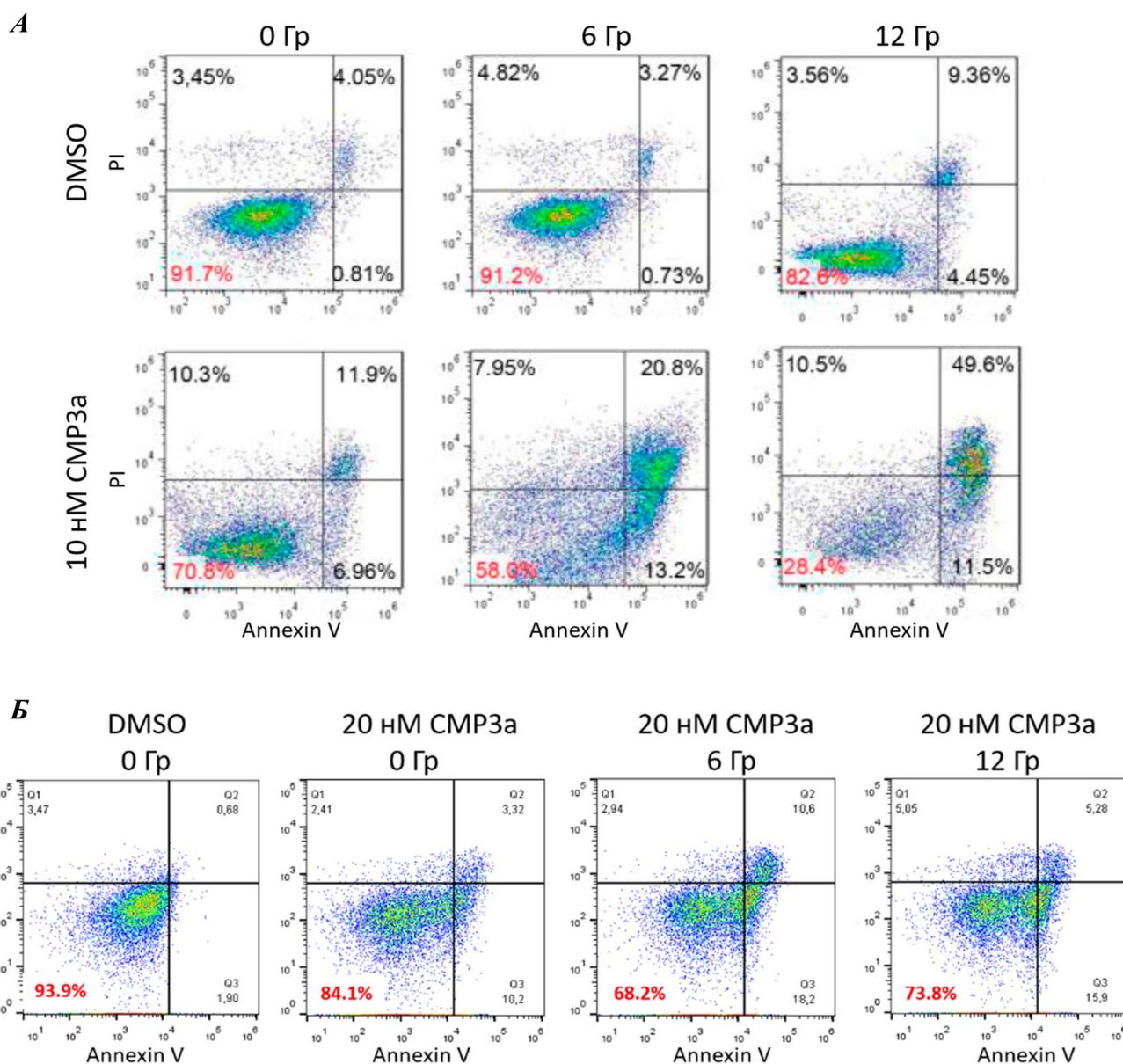


Рисунок 95. А – Детекция апоптоза в первичной культуре клеток глиобластомы человека, обработанных различными концентрациями СМР3а и различными дозами γ -излучение. Б – То же для нормальных человеческих астроцитов. В обоих экспериментах клетки окрашивались Аннексином V и йодистым пропидием, после чего апоптоз детектировался с помощью проточной цитофлуориметрии.

Наконец, мы исследовали возможность применения СМР3а совместно со стандартным методом радиотерапии. Из **рисунка 95А** видно, что добавление СМР3а в концентрации 10 нМ более чем в 4 раза усиливает действие γ -излучения на клетки глиобластомы. Так, без СМР3а доза в 12 Гр убивает лишь 13% клеток, однако при совместном использовании количество гибнущих клеток превышает 70%. Таким образом, мы полагаем, что СМР3а теоретически может быть использован и как самостоятельный противоопухолевый препарат, и как добавка, усиливающая эффект от радиотерапии. Важно отметить, что совместное действие γ -излучения и СМР3а на культуру нормальных человеческих астроцитов было намного слабее по сравнению с эффектом на клетки глиобластомы даже при удвоенной концентрации СМР3а (**Рис. 95Б**) [199].

4.3.2. Создание низкомолекулярного ингибитора белка *Survivin*.

В предыдущей главе мы показали, что мономер белка *Survivin* имеет крайне важные функции для опухолевых клеток. По этой причине мы решили изучить возможность ингибирования данного белка для лечения глиобластомы. Анализ экспрессии генов показал, что уровень *Survivin* повышен в стволовых клетках глиобластомы, но не в культурах человеческих астроцитов или предшественников нервных клеток (**Рис. 96А**). Далее мы сравнили экспрессию *Survivin* в опухолях головного мозга. Данные на **рисунках 96Б** и **96В** показывают, что уровень этого белка существенно повышен в рецидивах глиобластомы. Такой результат был получен как на общей коллекции срезов опухолей мозга, так и на парных образцах опухолей от одних и тех же пациентов до и после терапии. Основываясь на этих данных, мы предположили, что ингибитор мономера белка *Survivin* должен эффективно действовать на популяцию более агрессивных стволовых клеток глиобластомы, появляющихся после терапии.

Ранее с помощью крупномасштабного ЯМР скрининга библиотеки химических веществ было обнаружено соединение, влияющее на положение аминокислот участка димеризации белка *Survivin* [200]. Мы выбрали данную молекулу в качестве основы для компьютерного моделирования ингибиторов этого белка. На основании полученных гипотетических структур, нами было синтезировано 11 веществ, которые по результатам компьютерных предсказаний, должны связываться с высокой аффинностью с участком димеризации белка *Survivin* (**Рис. 97А**). Способность полученных соединений замедлять пролиферацию раковых клеток была проверена *in vitro* на первичной линии глиобластомы (**Рис. 97Б**). Результаты этого эксперимента показали, что вещество, названное «LLP3» (4-[3,5-бис(бензилокси)фенил]-6-(5-хлоро-2-гидроксифенил)-2-оксо-1,2-дигидропиридин-3-карбонитрил), эффективнее всего вызывает гибель опухолевых клеток.

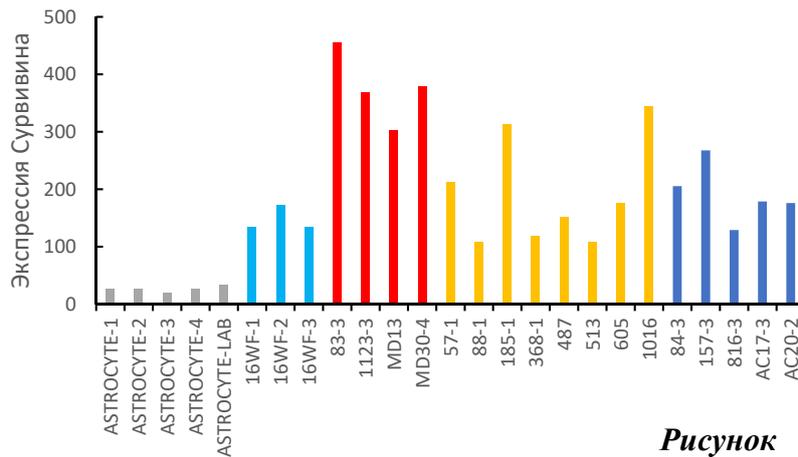
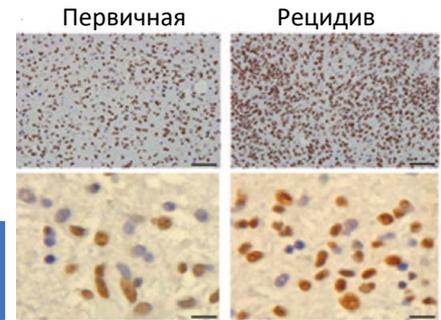
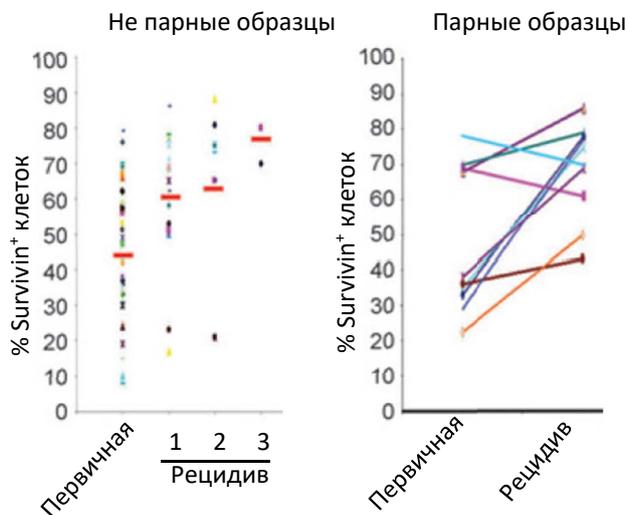
А**Б****В**

Рисунок 96. А – Экспрессия *Survivin* в астроцитах (серый), предшественниках нервных клеток (голубой), мезенхимальных стволовых клетках глиобластомы (красный), пронейрональных стволовых клетках глиобластомы (синий) и не охарактеризованных клетках глиобластомы (жёлтый). Б – Иммуногистохимическое окрашивание срезов первичных и рецидивирующих глиобластом антителами к белку *Survivin*. В – Сравнения количества клеток, экспрессирующих *Survivin*, в первичных и рецидивирующих глиобластомах.

Важно отметить, что по данным компьютерных расчётов, LLP3 способен одновременно взаимодействовать с обоими мономерами, входящими в состав димера белка *Survivin*. Другими словами, LLP3 связывается с димером на участке контакта двух мономеров и, вероятно, стабилизирует димерную форму существования белка *Survivin* (Рис. 97В). По приблизительным оценкам энергия димеризации белка *Survivin* составляет около 18 ккал/моль, тогда как энергия взаимодействия LLP-3 с димером *Survivin* примерно равна 12 ккал/моль. Такой результат означает, что LLP3 может вносить значительный вклад в стабилизацию димерной формы существования белка *Survivin*.

Чтобы подтвердить результаты компьютерных расчётов мы исследовали взаимодействие LLP3 с *Survivin* дикого типа, а также с мутантным белком *Survivin*^{F101A/L102A}, не способным образовывать димеров. Ранее мы обнаружили, что LLP3 обладает сильной флуоресценцией, интенсивность которой возрастает более чем в 4 раза после связывания с белком.

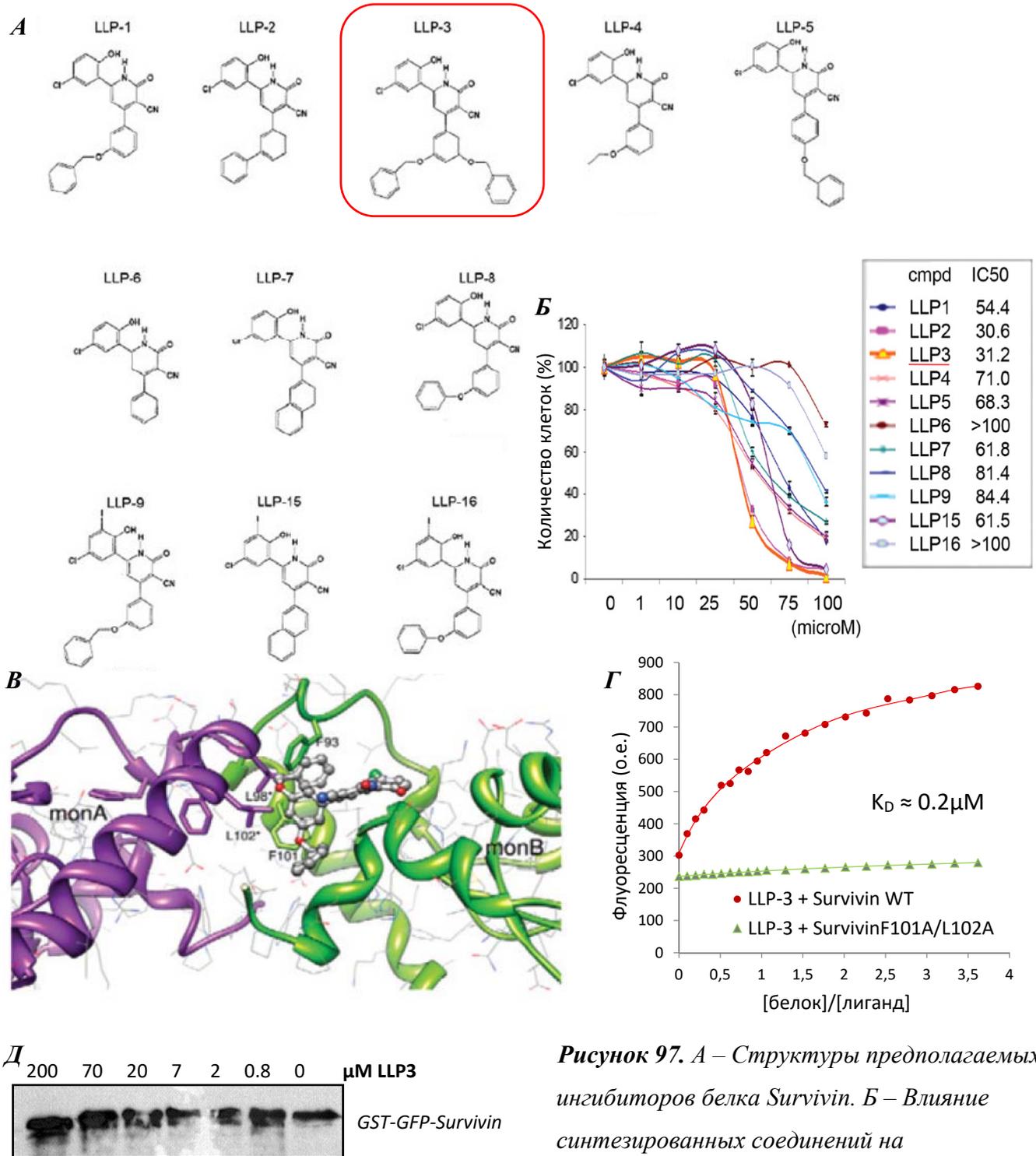


Рисунок 97. А – Структуры предполагаемых ингибиторов белка Survivin. Б – Влияние синтезированных соединений на жизнеспособность первичных культур клеток глиобластомы. В – Рассчитанная структура ингибитора белка Survivin, взаимодействующего с димерной формой этого белка. Г – Изменение интенсивности флуоресценции LLP3 при титровании 1 μM раствора LLP-3 рекомбинантным Survivin^{WT} или Survivin^{F101A/L102A}. Д – Иммунодетекции GST-GFP-Survivin, связанного с иммобилизованными мономерами His₆-Survivin в присутствии различных концентраций LLP3.

Мы использовали это свойство для исследования взаимодействия LLP3 с белком Survivin (Рис. 97Г). Рассчитанная константа диссоциации LLP3 от Survivin дикого типа составила около 0.2 мкМ, в то время как заметного связывания LLP3 с Survivin^{F101A/L102A} обнаружено не было. Далее мы исследовали влияние LLP3 на димеризацию рекомбинантного белка Survivin. Для этого мономеры His₆-Survivin^{WT} были иммобилизованы в лунках планшета в присутствии 2М мочевины и затем инкубированы с GST-GFP-Survivin и различными концентрациями LLP3. Связавшийся Survivin элюировался и детектировался методом иммуноблотинга с антителами к GFP. Результаты этого эксперимента (Рис. 97Д) подтверждают, что LLP3 действительно стабилизирует димеры белка Survivin.

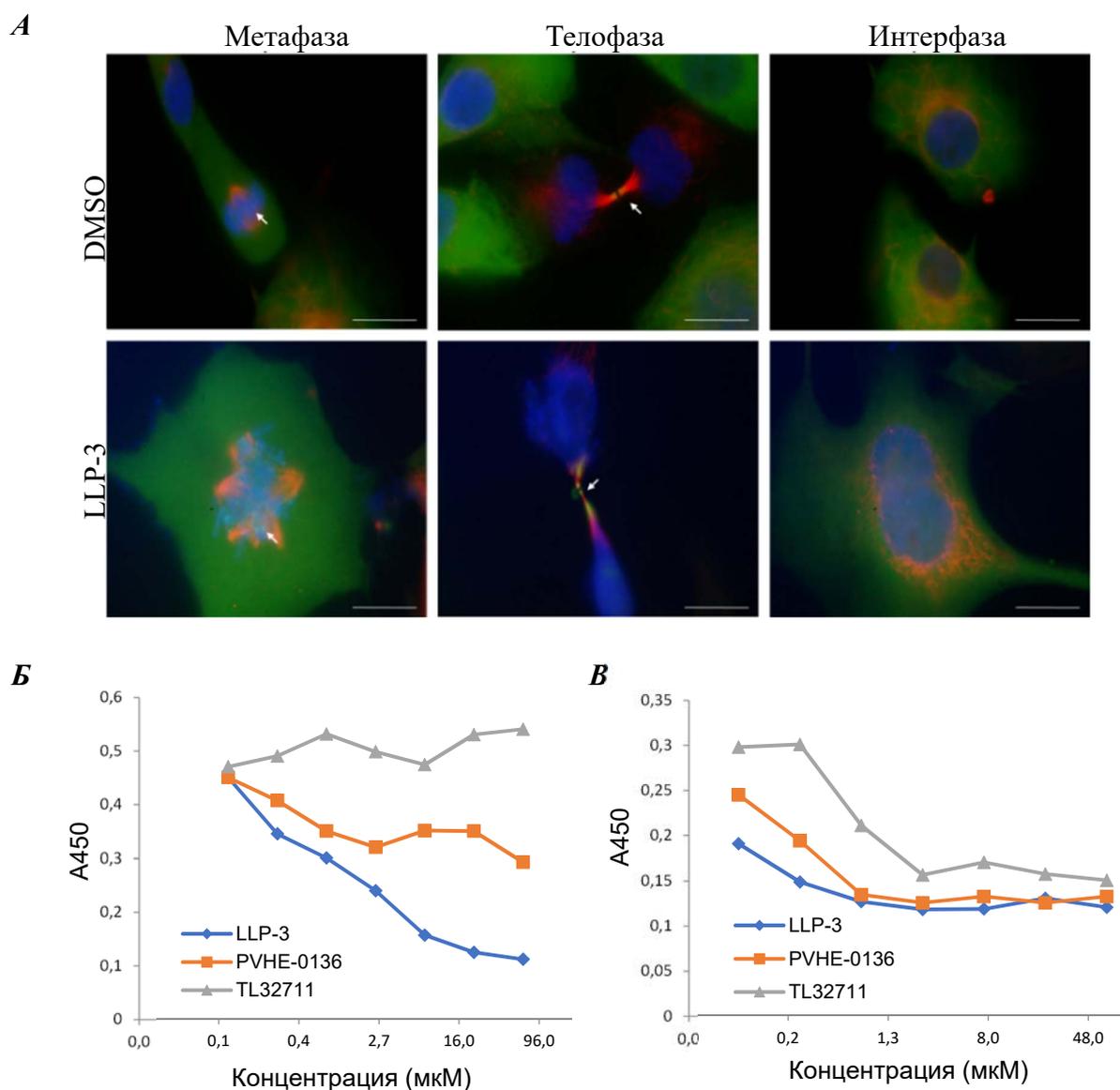


Рисунок 98. А – Флуоресцентная микрофотография клеток, окрашенных антителами на ацетилированный α -тубулин (красный), Survivin (зелёный) и красителем DAPI (синий). Клетки, обработанные 20 μ М LLP3 или DMSO (контроль), фотографировались на разных стадиях

митоза и в интерфазе. Б – Количество GST-GFP-Ran связавшегося с иммобилизованным белком His₆-Survivin в присутствии различных концентраций LLP3, TL32711 и PVHE0136. В – Количество His₆-Smac/DIABLO, связавшегося с иммобилизованным белком Survivin в аналогичных условиях. Детекция проводилась методом твёрдофазного ИФА с антителами на белки GFP или Smac/DIABLO соответственно.

Исследование механизма действия LLP3 на клетки глиобластомы показало, что это соединение вызывает многочисленные нарушения в процессе митоза (**Рис. 98А**), которые ранее были описаны при ингибировании взаимодействия белка Survivin с малой GTPазой Ran [73]. Используя соответствующие рекомбинантные белки, мы подтвердили, что LLP3 действительно способен ингибировать образование комплекса Survivin-Ran уже при концентрации 0,5 мкМ (**Рис. 98Б**). Далее мы сравнили LLP3 с двумя описанными ранее ингибиторами белка Survivin: (1) TL32711 – Бивалентный миметик белка Smac/DIABLO, связывающийся с В1R доменом Survivin [201], и (2) PVHE0136 – соединение, определённое в результате крупномасштабного скрининга химических библиотек, механизм действия которого не до конца изучен [202]. Из данных на **рисунках 98Б** и **98В** видно, что LLP3 существенно более эффективно, чем TL32711 и PVHE0136 ингибирует взаимодействия белка Survivin с GTPазой Ran и с Smac/DIBLO.

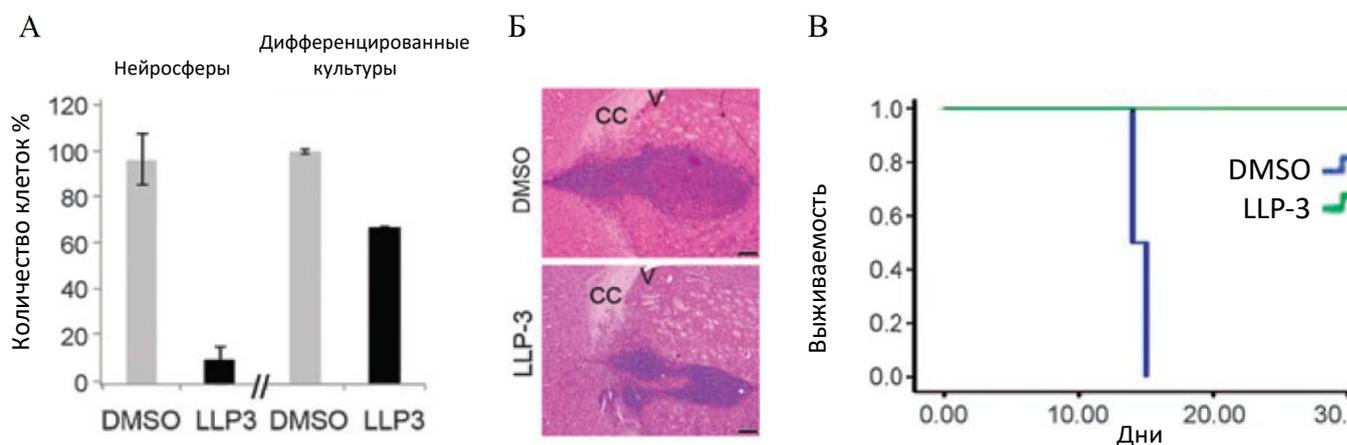


Рисунок 99. А – Влияние LLP3 на жизнеспособность культур, обогащённых стволовыми клетками глиобластомы, а также более дифференцированных клеток. Б – Окрашенные гематоксилином и эозином срезы мозга мышей, которым были трансплантированы клетки глиобластомы человека, после чего мышам внутрибрюшинно в течение 10 дней вводили LLP3 или растворитель. В – Кривая Каплана-Мейера, демонстрирующая выживаемость мышей, обработанных таким же образом, как и в «Б».

В заключение мы продемонстрировали, что LLP-3 *in vitro* гораздо эффективнее действует на культуры, обогащённые GSC, чем на более дифференцированные клетки глиобластомы (**Рис. 99А**). Исследование противоопухолевой активности LLP3 *in vivo* показало, что внутрибрюшинное введение препарата значительно замедляет рост интракраниальных опухолей, трансплантированных иммунодефицитным мышам, (**Рис. 99Б**) и увеличивает выживаемость животных (**Рис. 99В**). Суммируя всё вышесказанное, можно утверждать, что нами был разработан и протестирован новый низкомолекулярный ингибитор белка Survivin, который оказался существенно эффективнее двух аналогичных ингибиторов в опытах с рекомбинантными белками *in vitro*, и который без видимых побочных эффектов значительно замедляет рост глиобластомы в модельных мышах [203].

4.3.3. Создание низкомолекулярного ингибитора альдегид дегидрогеназы ALDH1A3.

Выше упоминалось, что одной из самых важных особенностей мезенхимальных клеток глиобластомы является изменённый тип метаболизма, который направлен на аэробный гликолиз, а не на окислительное фосфорилирование. Именно путь гликолиза при биоинформатическом анализе показывает наибольшие отличия при сравнении мезенхимальных клеток глиобластомы с любыми другими типами клеток опухолей головного мозга. Более того, среди всех 25 000 генов наибольшее отличие по уровню экспрессии между мезенхимальными стволовыми клетками глиобластомы и другими клетками наблюдаются именно для одного из участников гликолитического пути, фермента ALDH1A3 [110]. В связи с этим, не удивительно, что в последние годы этот белок используется как главный и наиболее достоверный маркер мезенхимальных стволовых клеток глиобластомы.

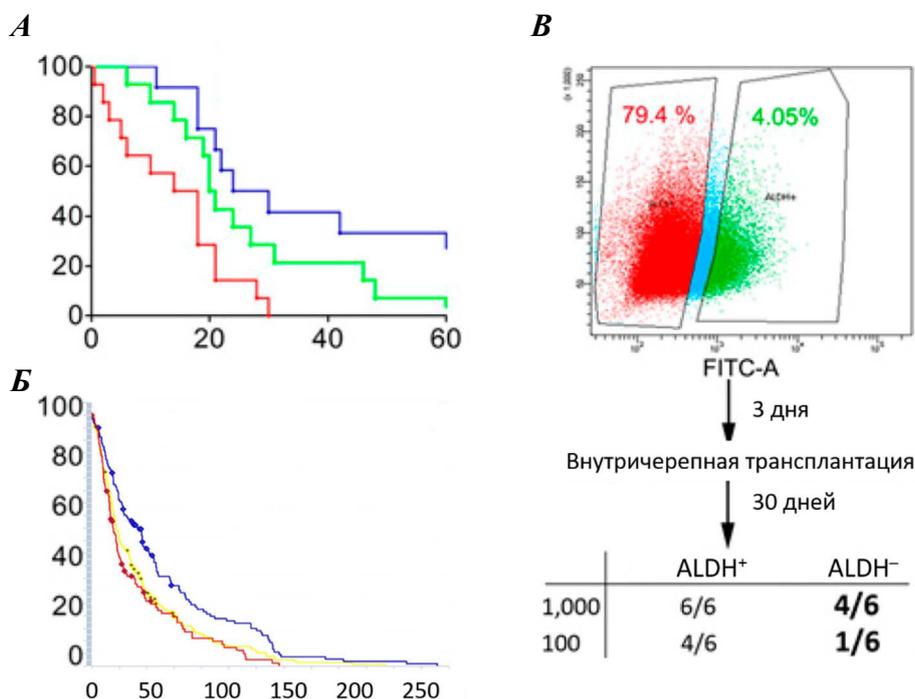


Рисунок 100. А – Кривая Каплан-Майера, показывающая выживаемость пациентов с глиобластомой, разделённых на 3 группы на основании интенсивности окрашивания опухолей антителами на ALDH1A3 ($p = 0.0016$). Б – Кривые Каплан-Майера, показывающие выживаемость пациентов с глиобластомой, разделённых на 3 группы на основании экспрессии ALDH1A3 ($p = 0.00008$); результаты получены с помощью биоинформатического анализа базы данных Rembrandt. Выживаемость пациентов с высокой экспрессией ALDH1A3 показана красной линией, со средней экспрессией жёлтой/зелёной и с низкой экспрессией – синей. В – Схема эксперимента по определению тьюморогенной способности клеток глиобластомы с высоким (ALDH⁺) и низким (ALDH⁻) уровнем окраски ALDEFUOR. ALDH⁺ и ALDH⁻ популяции клеток были получены с помощью сортировки окрашенных клеток и после 3х дней инкубации 100 или 1000 клеток были инжектированы в мозг иммунодефицитным мышам (по 6 мышей на группу). Через 30 дней было определено количество животных, у которых сформировалась опухоль мозга.

Мы предположили, что так как ALDH1A3 присутствует на высоком уровне в самой агрессивной популяции клеток глиобластомы, то, возможно, этот фермент является не только маркёром мезенхимальных GSC, но выполняет критически важные функции, обеспечивающие само существование этой клеточной популяции. Если такое предположение верно, то ингибирование активности ALDH1A3 должно привести к гибели мезенхимальных GSC.

Для того чтобы понять, какое значение ALDH1A3 имеет для развития глиобластом, мы в первую очередь определили, существует ли связь между экспрессией ALDH1A3 и выживаемостью пациентов. Окрасив образцы опухолей, собранные от 40 пациентов с глиобластомой, антителами к ALDH1A3 и сравнив полученные данные со сроком жизни больных, мы показали, что высокая экспрессия ALDH1A3 коррелирует с плохим прогнозом для выживаемости пациентов (**Рис. 100А**). Мы подтвердили эти результаты с помощью биоинформатического анализа базы данных Rembrandt (**Рис. 100Б**). Таким образом, ALDH1A3 действительно связана с более агрессивным поведением опухоли.

Следующим шагом мы решили подтвердить полученные данные на моделях глиобластомы *in vivo*. Для этого мы выделили популяции клеток с высокой и низкой альдегиддегидрогеназной активностью и инжектировали небольшое количество этих клеток (100 или 1000 штук) в мозг иммунодефицитным мышам. Из **рисунка 100В** видно, что ALDH⁺ популяция клеток имеет существенно более высокую тьюморогенную способность, чем ALDH⁻ популяция. Важно отметить, что ALDH⁺ клетки характеризуются высокой экспрессией фермента ALDH1A3 (**Рис. 90Б**). Таким образом, можно утверждать, что повышенный уровень ALDH1A3 является

одним из условий, необходимых для агрессивного поведения глиобластомы.

Основываясь на этих данных, мы решили создать новый низкомолекулярный ингибитор ALDH1A3. Скрининг природных соединений, проведённый ранее, выявил вещество даидзин как потенциальный ингибитор ферментов семейства ALDH1 [204]. Используя рациональный дизайн, мы смоделировали структуру и синтезировали молекулы сходные по строению с даидзином, однако предположительно обладающие улучшенными фармакокинетическими свойствами и возможностью проникать через гематоэнцефалический барьер. Среди синтезированных соединений два показывали способность ингибировать альдегид дегидрогеназную активность *in vitro* (Рис. 101А и 101Б). Эти молекулы были названы GA11 и GA23. Мы сравнили эффект от этих соединений на пролиферации культур, обогащённых мезенхимальными стволовыми клетками, культур, обогащённых пронейрональными стволовыми клетками глиобластомы, а также линии нормальных человеческих астроцитов. Из рисунка 100В видно, что оба соединения наиболее эффективно действуют именно на мезенхимальные клетки, однако значение IC₅₀ для ингибитора GA11 (2,6-дифенилмидазо[1,2-а]пиридин) оказалось ниже, поэтому он был выбран для экспериментов на модельных животных. Как видно из рисунка 100Г, внутрибрюшинное введение раствора GA11 статистически значимо увеличивает выживаемость животных, в мозг которым были трансплантированы человеческие клетки глиобластомы мезенхимального фенотипа.

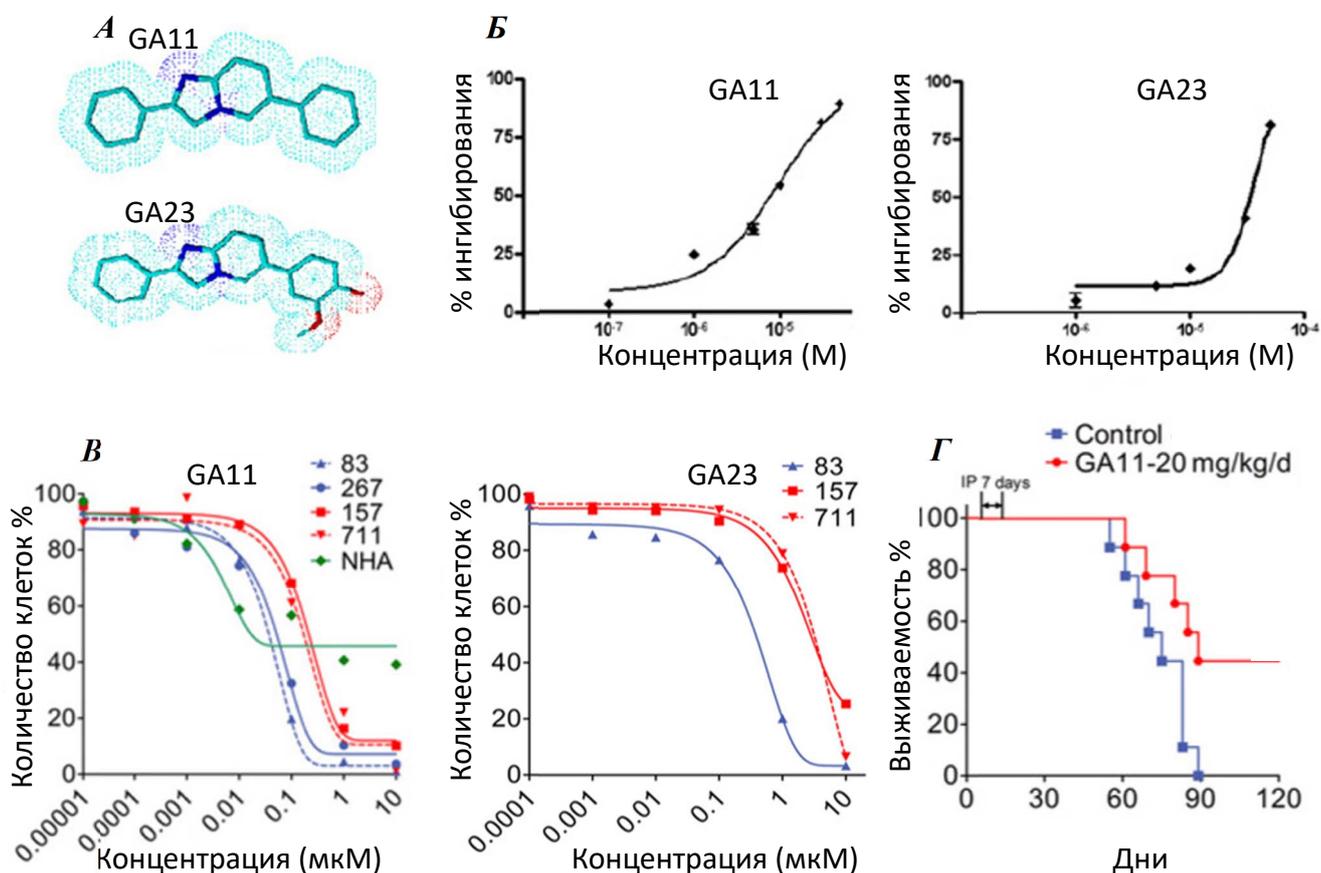


Рисунок 101. А – Структуры предполагаемых ингибиторов ALDH1A3. Б - Относительная альдегид дегидрогеназная активность ALDH1A3 при инкубации с различными концентрациями GA11(слева) и GA23 (справа). В - Влияние GA11 (слева) и GA23 (справа) на жизнеспособность нормальных человеческих астроцитов (зелёный), мезенхимальных клеток глиобластомы (синий) и пронейрональных клеток глиобластомы (красный), полученных от различных пациентов. Г - Кривая Каплана-Мейера, демонстрирующая выживаемость мышей, в мозг которых были трансплантированы клетки глиобластомы человека, после чего мышам внутрибрюшинно в течение 7 дней вводили GA11 или растворитель.

Суммируя данные, описанные выше, можно сказать, что нами было создано первое соединение, направленно убивающее наиболее агрессивную популяцию клеток глиобластомы-мезенхимальные GSC. Мы надеемся, что дальнейшая доработка и модификация этой молекулы позволит увеличить её активность и специфичность действия и, возможно, приведёт к созданию нового препарата для лечения глиобластомы [205].

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

В предыдущей главе мы обсуждали возможность создания препаратов для уничтожения стволовых клеток глиобластомы, однако известно, что стволовые клетки зачастую обладают способностью активно удалять из себя вредные соединения [206]. Таким образом, даже если нам удастся обнаружить молекулярную мишень, которая критически важна для существования стволовых клеток глиобластомы, создать соответствующий препарат, проникающий сквозь гематоэнцефалический барьер и накапливающийся в опухоли, всё равно будет высокий шанс того, что это соединение сможет уничтожить лишь дифференцированные раковые клетки, а небольшая популяция стволовых опухолевых клеток останется нетронутой из-за механизмов активного экспорта лекарств из цитоплазмы. В дополнение к этому, отдельной, однако не менее важной проблемой, является и внутриклеточное распределение препарата. Так слишком гидрофильные молекулы могут плохо проходить сквозь плазматическую мембрану, а слишком гидрофобные наоборот будут накапливаться в липидном бислое и не доходить до своей внутриклеточной мишени. Таким образом, для успешной разработки новых методов противоопухолевой терапии необходимо иметь возможность оценивать распределение препарата как в пределах ткани, так и внутри единичных клеток. Для решения этой проблемы мы использовали метод TOF-SIMS масс-спектрометрии.

4.4.1. Применение TOF-SIMS для анализа единичных клеток глиобластомы.

TOF-SIMS (Time of flight secondary ion mass spectrometry; масс-спектрометрия вторичных ионов) в основном используется для анализа наноматериалов, а также исследований внеземных объектов в космосе [207]. Принцип метода заключается в ионизации поверхности твёрдого образца пучком первичных ионов с различной энергией и последующей детекции вторичных ионов на времяпролётном масс-спектрометре. Уникальной особенностью TOF-SIMS является возможность сканирования как крупных, так и мелких объектов размерами от нескольких микрометров до сантиметра с пространственным разрешением до 200 нм по ширине и до 10 нм по глубине. Диапазон детектируемых m/z простирается от 1 до 1000. Важно отметить, что для каждого единичного участка исследуемого образца (пикселя на картинке) удаётся записать полный спектр как положительно, так и отрицательно заряженных ионов. Это позволяет получать изображения распределения всех детектируемых молекул как на поверхности, так и в глубине объекта. Несмотря на такие замечательные характеристики, TOF-SIMS почти не используется для анализа биологических материалов, так как при стандартных настройках энергия первичных ионов слишком велика для мягкой ионизации сложных органических соединений [208].

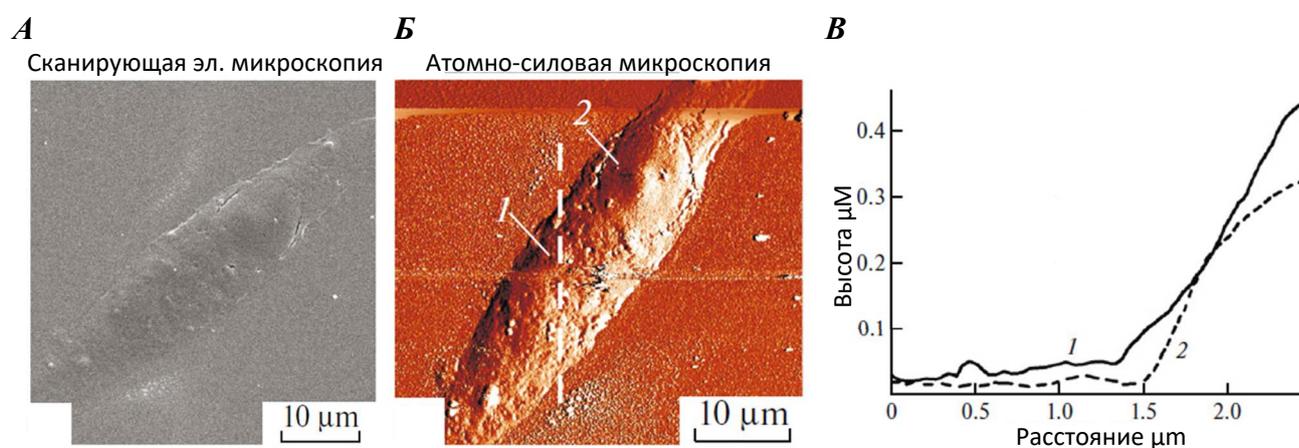


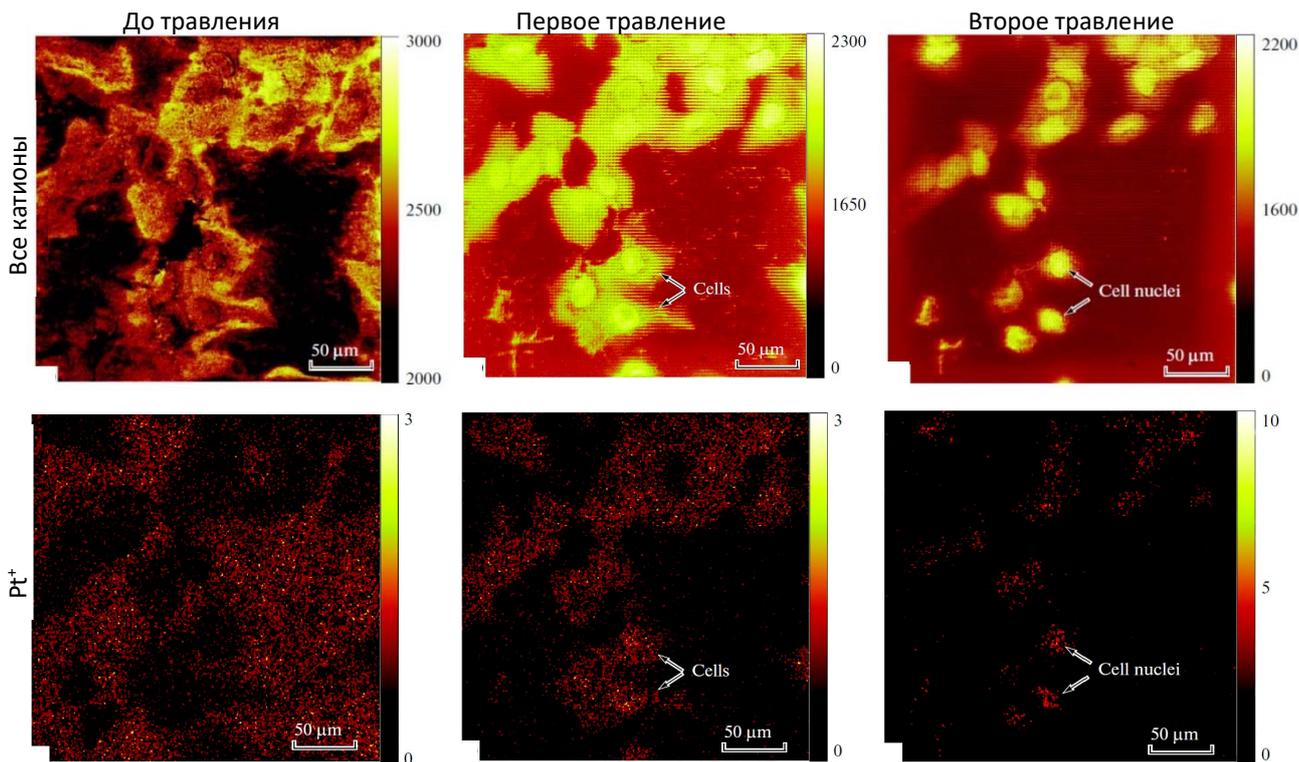
Рисунок 102. А – Удаление наружной плазматической мембраны с помощью бомбардировки клеток ионами Cs^+ . Клетки глиобластомы выращивали на кремниевой подложке, после чего фиксировали, высушивали и часть клетки (сверху справа) бомбардировали ионами Cs^+ . После бомбардировки изображение клетки получали с помощью сканирующего электронного микроскопа (слева) и атомно-силового микроскопа (в центре). На графике справа приведён профиль поверхности участка клетки, не бомбардированного (1) и бомбардированного (2) ионами Cs^+ .

После длительной оптимизации условий, используя первичные ионы Bi_3^+ (кластер из трёх атомов с единичным положительным зарядом), нам удалось найти режим ионизации, позволяющий детектировать внутри клетки несколько сотен различных низкомолекулярных соединений, таких как липиды, аминокислоты и некоторые продукты метаболизма углеводов. Более того, используя высокоэнергичные ионы Cs^+ , мы разработали методику послойного удаления частей клетки (травления). На **рисунке 102** показана фиксированная клетка, с половины которой была удалена наружная мембрана. На изображениях, полученных с помощью сканирующего электронного (**Рис. 102А**) и атомно-силового (**Рис. 102Б**) микроскопов, чётко видна поверхность ядра, обнажившаяся после исчезновения плазматической мембраны. Таким образом, созданный нами метод позволяет удалять по 10-20 нм материала с поверхности клетки и проводить послойное сканирование, детектируя распределение разнообразных молекул на различных глубинах образца (**Рис. 102В**).

Используя поочерёдные бомбардировки клеток ионами Bi_3^+ (запись спектров) и Cs^+ (травление), мы проанализировали поверхность и внутреннее содержимое клеток глиобластомы, обработанных цисплатином *in vitro*. Для того чтобы визуализировать клетки, мы генерировали изображения эмиссии всех вторичных катионов. Из **рисунков 103А** (слева) и **103Б** видно, что при сканировании поверхности образца цисплатин детектировался на подложке между клетками, но не на клеточной мембране. Этот результат свидетельствует о том, что данное лекарство не задерживается у поверхности клеток и сразу транспортируется в цитоплазму. Далее мы удалили плазматическую мембрану и повторно просканировали образцы. На **рисунках 103А** (в центре) и **103Б** заметное значительное количество ионов Pt^+ внутри клеток. Наконец, после второго раунда травления, удаляющего ядерную оболочку (**Рис. 103А** (справа) и **103Б**), мы детектировали самую высокую концентрацию цисплатина внутри ядер клеток. Такой результат хорошо демонстрирует механизм транспортировки этого препарата – вначале происходит захват цисплатина с поверхности клеток и далее, не накапливаясь в цитоплазме, он перемещается в ядро, где наблюдается его самая высокая концентрация, и где происходит действие данного лекарства на опухолевые клетки [132].

Описанный результат подтверждает возможность метода TOF-SIMS детектировать распределение некоторых противоопухолевых препаратов внутри клеток глиобластомы [209-211]. Важно отметить, что нам удалось не только обнаружить накопление цисплатина в клетках, но и также увидеть изменения, происходящие в липидном составе этих клеток под действием лекарства. Так в обработанных цисплатином клетках мы детектировали дополнительный пик, относящийся, по всей видимости, к иону сфингозина ($[\text{C}_{18}\text{H}_{36}\text{NO}_2+\text{Na}]^+$), который, как было показано ранее, появляется в клетках при индукции апоптоза [212].

A



B

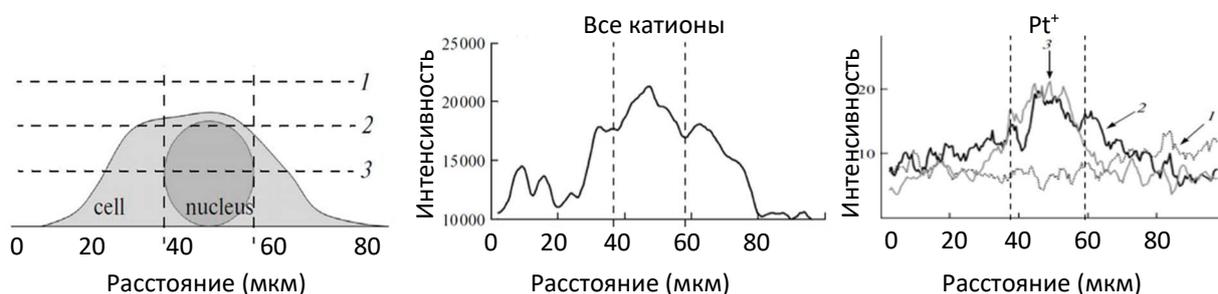


Рисунок 103. А – Клетки глиобластомы выращивали на кремниевой подложке, обрабатывали цисплатином, после чего фиксировали, высушивали и анализировали с помощью TOF-SIMS масс-спектрометра. Во время эксперимента клетки вначале сканировали с помощью ионов Bi^{3+} (изображения слева), затем бомбардировали ионами Cs^{+} , затем снова сканировали ионами Bi^{3+} (изображения в центре), потом повторно бомбардировали ионами Cs^{+} и, наконец, третий раз сканировали ионами Bi^{3+} (изображения справа). Сверху приведены изображения, иллюстрирующее выход всех вторичных катионов, а снизу выход ионов Pt^{+} . Б – Схематическое изображение сканирования клетки до (1) и после (2, 3) раундов травления ионами Cs^{+} (слева), а также интенсивность эмиссии всех вторичных ионов (в центре) и ионов Pt^{+} (справа) на различном расстоянии от клеточного ядра: 1- до травления, 2- после первого травления, 3- после второго травления.

4.4.2. Применение TOF-SIMS для анализа опухолевой ткани глиобластомы.

Получив интересные данные при анализе единичных клеток, мы перешли к исследованию тканей, полученных от пациентов с глиомой, сохраняя при этом пространственное разрешение, позволяющее различать отдельные клетки.

В первую очередь мы исследовали опухоль, образованную в мозге иммунодефицитной мыши после инъекции человеческих клеток глиобластомы. Данный образец был выбран в связи с тем, что в нём присутствует чёткая граница между опухолью и нормальной тканью (**Рис. 104А**). Проанализировав замороженный срез мозга, мы показали, что метод TOF-SIMS позволяет легко отличить здоровую ткань от глиобластомы. На **рисунке 104Б** представлены изображения, показывающие эмиссию вторичных ионов на границе опухоли и нормального мозга. Из результатов этого эксперимента видно, что для раковой ткани характерно повышенное содержание глутамина и пониженное количество моноацилглицерида. Важно отметить, что избыточное накопление глутамина в глиобластомах было многократно продемонстрировано ранее [213]. Таким образом, данные, полученные с помощью TOF-SIMS, хорошо согласуются с литературными.

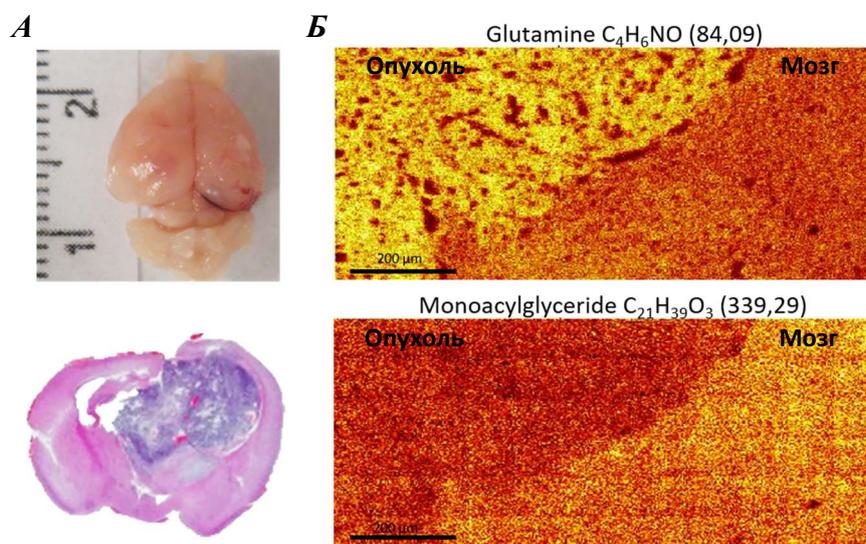


Рисунок 104. А – Мозг мыши со сформированной опухолью (сверху) и срез данного мозга, окрашенный гематоксилином и эозином (снизу). Б – Анализ среза мозга мыши с опухолью на TOF-SIMS масс-спектрометре. На рисунке показана интенсивность эмиссия ионов глутамина, и моноацилглицерида.

Далее мы приступили к исследованию образцов человеческих опухолей. Для этого мы проанализировали парафиновые срезы, полученные от 45 пациентов с глиомами разных стадий и 15 пациентов с эпилепсией (использованы в качестве контроля). С помощью TOF-SIMS мы детектировали более 300 пиков, соответствующих различным соединениям, 50 из которых были взяты для дальнейшей обработки. Компьютерный анализ интенсивности этих пиков позволил выявить три группы образцов, довольно сильно отличающихся друг от друга (**Рис. 105А**). Сравнив эти группы с историями болезни пациентов, мы обнаружили существенную связь между разделением образцов, основанном на данных TOF-SIMS, и клиническими характеристиками исследуемых тканей.

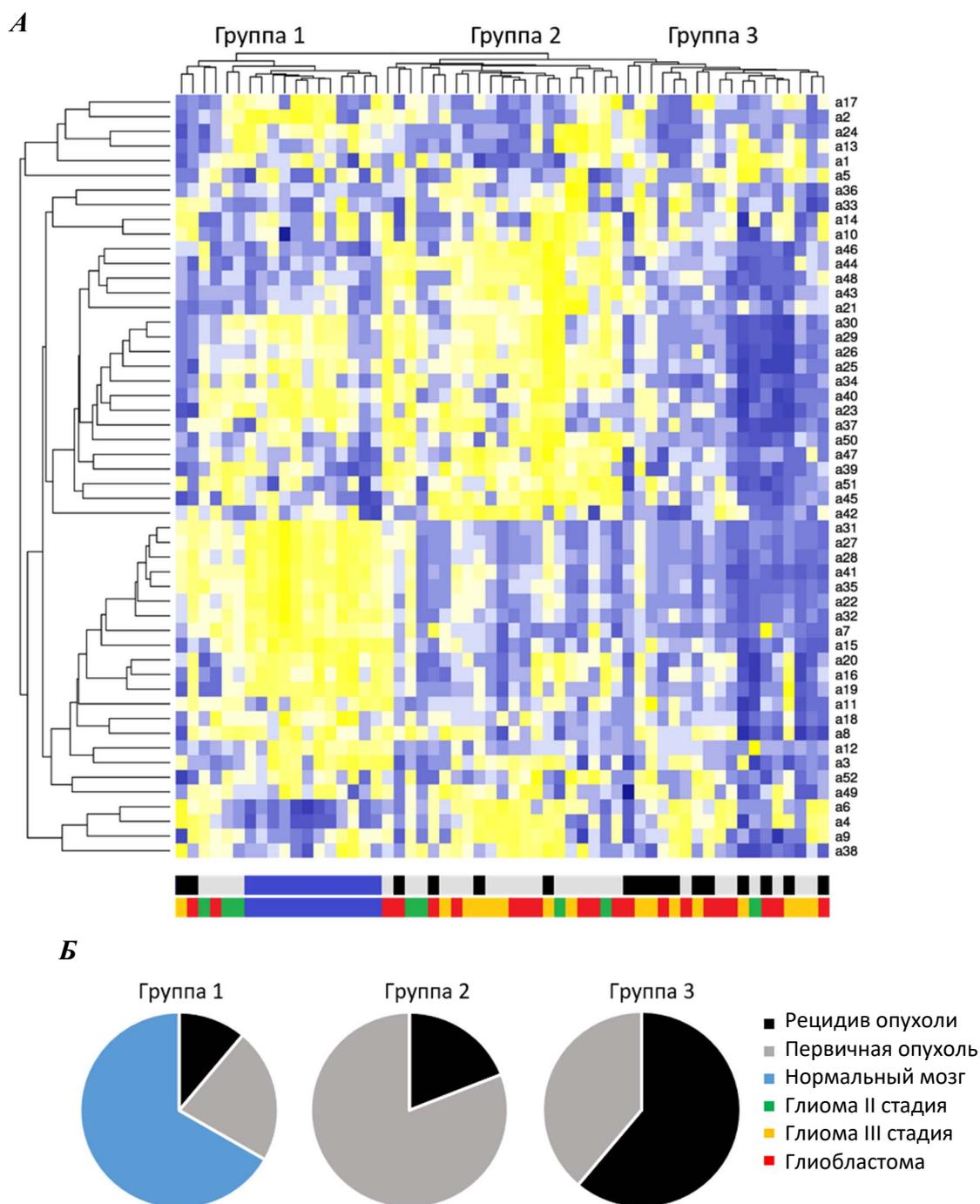


Рисунок 105. А – Уровни метаболитов, детектированных с помощью TOF-SIMS при анализе срезов 45ти глиом различных стадий и 12 образцов нормального мозга человека. Тепловая карта отражает относительное количество каждой из детектированных молекул, а также кластеризацию образцов на группы. Шкалы под тепловой картой показывают клинические характеристики образцов (чёрный – рецидив опухоли, серый – первичная опухоль, синий – нормальный мозг, зелёный – глиома 2ой стадии, жёлтый – глиома третьей стадии, красный - глиобластома). Б – Содержание различных образцов в каждой из 3х выявленных групп (чёрный – рецидив опухоли, серый – первичная опухоль, синий – нормальный мозг).

Из **рисунка 105Б** видно, что первая группа состоит в основном из образцов нормальной ткани, более 75% второй группы составляют первичные опухоли, а в третью группу, напротив, преимущественно входят рецидивы опухолей после терапии. Очень важно отметить, что все контрольные образцы оказались кластеризованы рядом, и ни один из них не попал во вторую или третью группы. Кроме того, интересно, что мы не обнаружили заметной связи между группами TOF-SIMS и стадией глиомы, хотя именно стадия считается основным отличительным признаком опухоли. Такой результат подчеркивает описанные нами в предыдущих главах фундаментальные различия между метаболизмом глиобластомы до и после терапии.

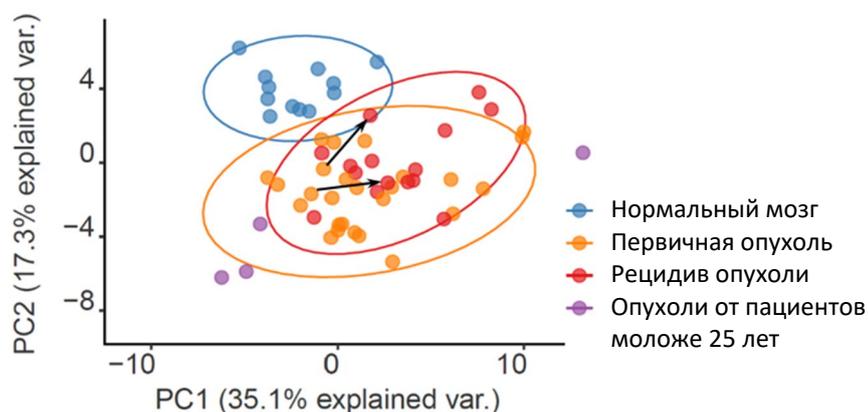


Рисунок 106. PCA анализ содержания детектированных с помощью TOF-SIMS молекул в образцах, полученных от различных пациентов: синий - нормальный мозг, жёлтый – первичные глиомы, красный – рецидивы глиом, фиолетовый – глиомы, полученные от пациентов моложе 25 лет. Эллипсы – демонстрируют доверительный интервал 95%. Стрелки показывают изменение опухолей, полученных от одного и того же пациента до и после терапии.

Чтобы получить дополнительную информацию из наших, данных далее мы применили анализ методом принципиальных компонент (PCA). График на **рисунке 106** хорошо демонстрирует большую разницу между образцами нормального мозга и глиомами. Кроме того, интересно отметить, что опухоли, полученные от молодых пациентов (менее 25 лет) кластеризуются отдельно от общей массы глиом. Такой результат может говорить или о другой природе генетических изменений, лежащих в основе канцерогенеза у молодых пациентов, или о ином состоянии мозга в целом [214]. Различия между первичными и вторичными опухолями из результатов PCA не столь заметны, однако, обратив внимание на две пары образцов, полученных от одного и того же пациента до и после терапии, видна тенденция, что лечение вызывает сходные изменения, проявляющиеся в рецидивах опухолей.

Данные, описанные выше, основаны исключительно на детекции низкомолекулярных соединений, так как метод TOF-SIMS не способен идентифицировать белки. Чтобы преодолеть это ограничение, мы решили разработать оригинальную методику, позволяющую измерять количество интересующего нас белка в любых образцах параллельно с детекцией метаболитов. Для этого вместо того, чтобы определять белки напрямую, мы использовали первичные антитела, конъюгированные с золотыми наночастицами. Мы предположили, что окраска образца такими антителами и последующая детекция вторичных ионов золота позволит определить относительное содержание белка, к которому были получены антитела. После длительной оптимизации условий нами была создана следующая методика: срез опухоли окрашивали антителами, конъюгированными с золотыми наночастицами, затем фиксировали, многократно промывали очищенной водой и высушивали в вакууме. Далее низкомолекулярные соединения детектировались с помощью ионизации ионами Bi_3^+ , излишек органических молекул испаряли ионами Cs^+ , после чего золото ионизировали ионами Bi^+ (**Рис. 107**).

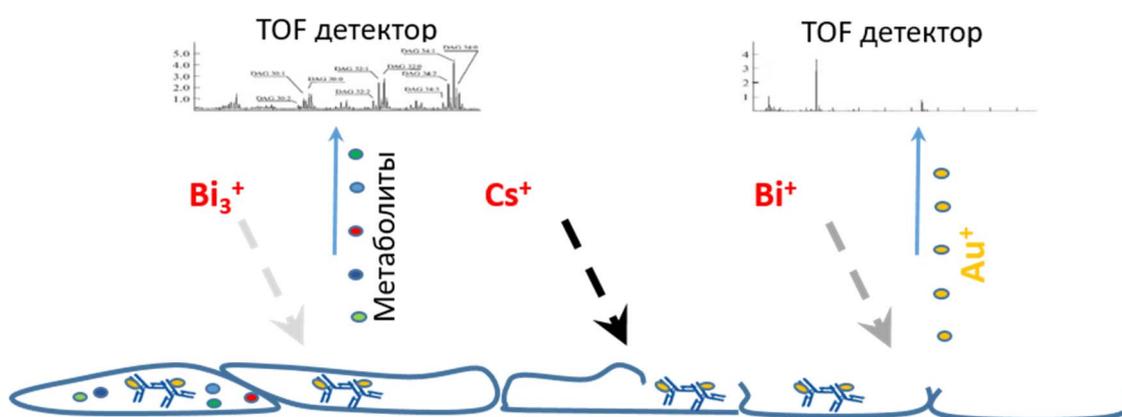


Рисунок 107. Схематическое изображение использования TOF-SIMS для последовательной детекции метаболитов и молекул белка, окрашенных с помощью антител, конъюгированных с золотыми наночастицами.

В качестве мишени для первого эксперимента мы выбрали белок Кавеолин-1, количество которого коррелирует с содержанием холестерина в клеточной мембране [215], а высокое содержание холестерина, в свою очередь, характерно для стволовых опухолевых клеток [216]. На **рисунке 108А** приведена стандартная окраска среза глиобластомы человека первичными антителами на Кавеолин-1 и вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена. На **рисунке 108Б** показано изображение, полученное при TOF-SIMS анализе другого среза глиобластомы, окрашенного антителами на Кавеолин-1, конъюгированными с золотыми наночастицами. На этом срезе мы одновременно детектировали ионы золота (слева) и холестерин (справа). Из полученных данных видно, что окрашивание антителами на Кавеолин-1 выглядит сходным образом в независимости от метода детекции (активность пероксидазы или ионизация золота), кроме того, была заметна частичная колокализация Кавеолина-1 с холестерином, что совпадает с литературными данными. Таким образом, мы впервые смогли осуществить детекцию белка и холестерина на одном и том же срезе человеческой опухоли, а также наблюдали единичные клетки или группы клеток богатые холестерином, которые могут представлять собой стволовые клетки глиобластомы.

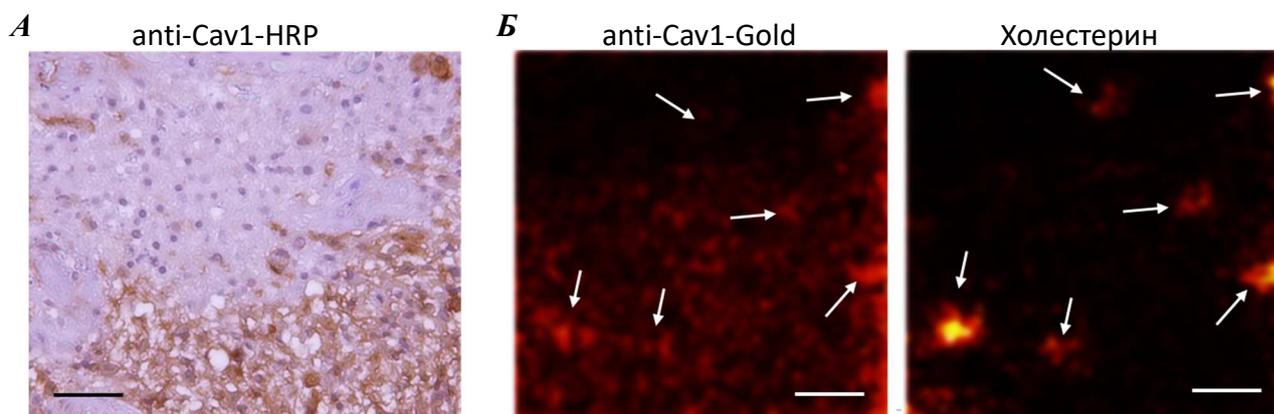


Рисунок 108. А – Окрашивание среза глиобластомы человека первичными антителами к Кавеолину-1 и вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена. Б – Анализ среза глиобластомы человека с помощью TOF-SIMS масс-спектрометрии. Срез опухоли был окрашен антителами к Кавеолину-1, конъюгированными с золотыми наночастицами. Изображения иллюстрируют выход вторичных ионов золота (слева) и вторичных ионов холестерина (справа).

Для того чтобы подтвердить, что созданный нами метод позволяет получать клинически значимые данные, мы сравнили распределение Кавеолина-1, определённое при детекции ионов золота методом TOF-SIMS, в образцах глиомы с распределением экспрессии соответствующего

гена, рассчитанной при анализе базы данных TCGA. Из **рисунка 109А** видно, что согласно данным TCGA высокая экспрессия Кавеолина-1 коррелирует с плохим прогнозом для выживаемости пациентов в глиомах II-III стадий и в глиобластомах. Результаты, полученные с использованием разработанной нами методики, выглядят сходным образом (**Рис. 109Б**). Всё это позволяет надеяться на достоверность данных TOF-SIMS.

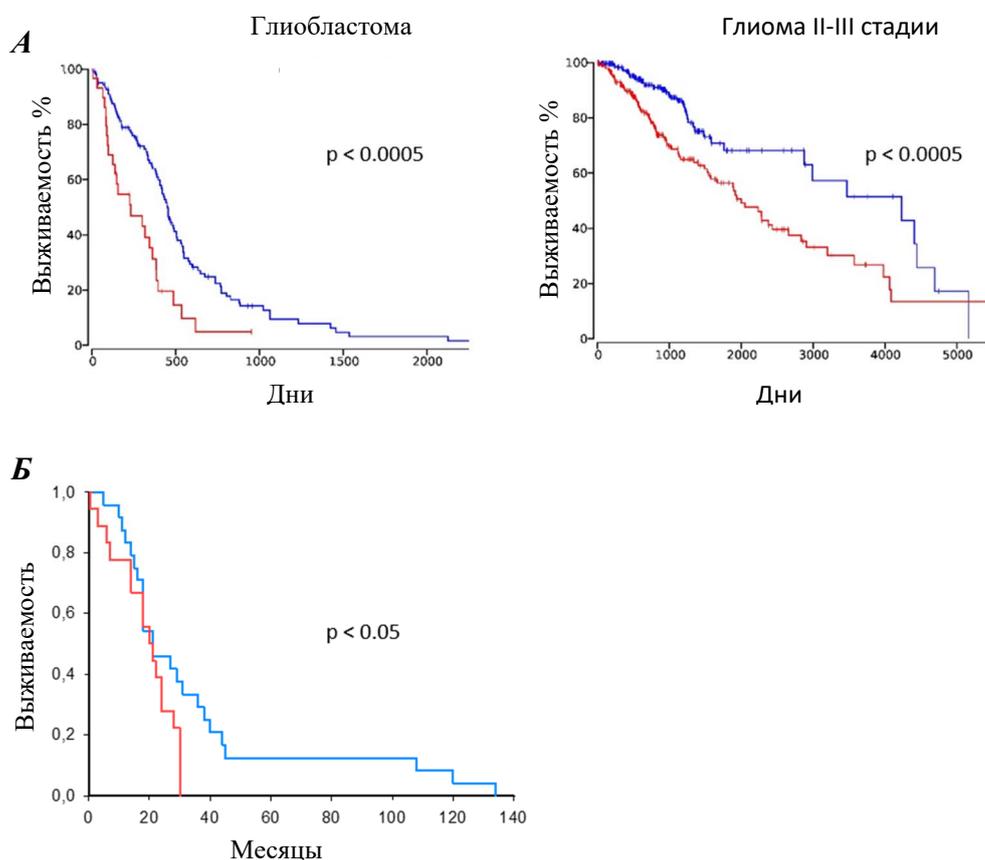


Рисунок 109. А – Кривые Каплан-Майера, показывающая выживаемость пациентов с глиобластомой (слева) и глиомой II-III стадии (справа), разделённых на 2 группы на основании экспрессии гена *Cav1* ($p = 0.0005$); результаты получены с помощью биоинформатического анализа базы данных TCGA. Б – Кривые Каплан-Майера, показывающая выживаемость пациентов с глиомами, разделённых на 2 группы на основании интенсивности детекции ионов золота, методом TOF-SIMS.

Суммируя всё вышесказанное, можно утверждать, что нами был разработан совершенно новый метод, позволяющий детектировать белки, низкомолекулярные соединения и противоопухолевые препараты в срезах человеческих глиом и в единичных клетках. Основными достоинствами этого метода являются высокое пространственное разрешение (до 200 нм в ширину и до 10 нм в глубину), возможность анализа любых образцов (клетки, ткани,

парафиновые срезы опухолей, замороженные срезы опухолей) и, наконец, быстрота анализа, так как подготовка пробы (в случае детекции низкомолекулярных соединений) и сканирование одного образца занимают не более 20 и 10 минут, соответственно. Мы надеемся, что после некоторой доработки метод TOF-SIMS позволит детектировать широкий спектр противоопухолевых препаратов внутри клеток, а также даст возможность экспресс анализа для определения границ между опухолью и нормальной тканью после биопсии или даже во время хирургии.

5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

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

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

Во второй части работы мы впервые продемонстрировали, что сплайсосомные белки могут быть экспортированы из клеток. Основываясь на многочисленных экспериментах, мы предположили принципиально новый механизм межклеточной коммуникации, осуществляемый с помощью транспорта сплайсосомных белков, заключенных в везикулы. Данные, подтверждающие нашу гипотезу, были получены на двух совершенно разных типах рака и поэтому мы надеемся, что такой механизм, как минимум, является общим для всех или почти всех типов опухолей, а возможно также существует и в нормальных тканях человеческого организма. Развивая эту гипотезу, мы предположили модель эволюции опухолей головного мозга, основанную на том, что апоптотические клетки, обильно возникающие на поздних этапах развития опухоли, а также после терапии, могут способствовать мезенхимальной трансформации соседних выживших клеток, что в итоге придаёт глиобластоме более агрессивные свойства. Кроме того, в этой части работы мы впервые исследовали функции белка RBM11, которые ранее оставались загадкой.

В третьей части работы мы создали и протестировали на модельных животных три новых противоопухолевых препарата, вызывающих гибель наиболее агрессивных стволовых и мезенхимальных клеток глиобластомы (**Рис. 110**). Среди этих ингибиторов хочется отметить СМР3а, который эффективно убивал клетки глиобластомы в концентрации 10-100 нМ. Для сравнения, чтобы добиться такого же эффекта с темозоламидом, стандартным препаратом для

лечения глиобластомы, необходимо использовать концентрацию 100-200 мкМ, что как минимум на 3 порядка выше, чем для СМР3а. С другой стороны, хочется отметить созданный нами ингибитор LLP3, который хотя и менее эффективен, однако с биохимической точки зрения обладает интереснейшим механизмом действия, основанным на стабилизации димерной формы Сурвивина.

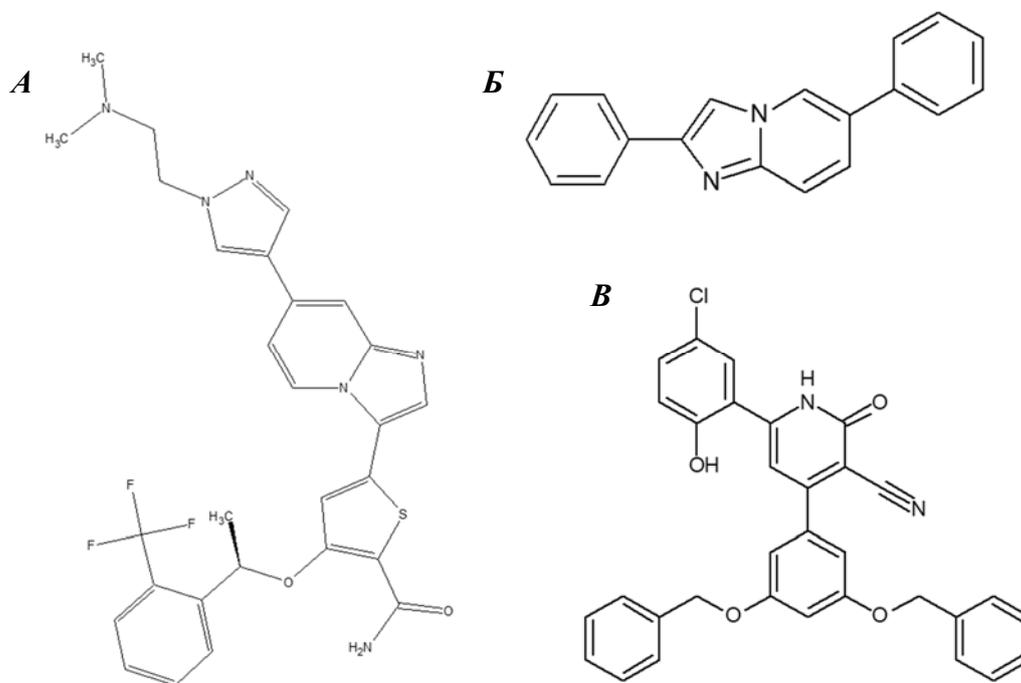


Рисунок 110. Химические структуры СМР3а (А), G11 (Б) и LLP3 (В).

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

6. ВЫВОДЫ

1. Исследованы молекулярные механизмы антиапоптотического действия белков Морталин, Сурвивин, Параоксоназа 2 и Трансглутаминаза 2.
2. Разработан метод для детекции изменений конформации белка Трансглутаминаза 2 в режиме реального времени в единичных живых опухолевых клетках.
3. Показано, что при индукции апоптоза клетки глиобластомы и рака яичника секретируют РНК и белковые компоненты сплайсосом, заключённые внутри везикул.
4. Предположен новый механизм межклеточной коммуникации, основанный на транспорте сплайсосомных белков между клетками.
5. Предположен новый механизм мезенхимальной трансформации клеток глиобластомы, индуцируемый апоптотическими клетками.
6. Исследованы функции белка RBM11 в опухолевых клетках.
7. Создано три новых противоопухолевых препарата, убивающих популяции стволовых и мезенхимальных клеток глиобластомы: (1) LLP3: ингибитор белка Сурвивин, связывающийся с Сурвивином с $K_d = 0.2 \mu\text{M}$ и убивающий клетки глиобластомы с $IC_{50} = 30 \mu\text{M}$; (2) CMP3a: ингибитор киназы NEK2, ингибирующий активность NEK2 с $IC_{50} = 0,015 \mu\text{M}$ и убивающий клетки глиобластомы с $IC_{50} = 0,01-0,05 \mu\text{M}$; (3) GA11: ингибитор альдегид дегидрогеназы ALDH1A3, ингибирующий активность ALDH1A3 с $IC_{50} = 10 \mu\text{M}$ и убивающий клетки глиобластомы с $IC_{50} = 0,2-0,5 \mu\text{M}$.
8. Разработан метод анализа клеток и срезов опухолей головного мозга с помощью TOF-SIMS масс-спектрометрии.

7. СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics/ J.F. Kerr, A.H. Wyllie, A.R. Currie// *Br J Cancer*.-1972.-Vol.26; no.4.-P.239-57.
2. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018/ L. Galluzzi, I. Vitale, S.A. Aaronson, et al.// *Cell Death Differ*.-2018.-Vol.25; no.3.-P.486-541.
3. Autophagy-dependent cell death - where, how and why a cell eats itself to death/ S. Bialik, S.K. Dasari, A. Kimchi// *J Cell Sci*.-2018.-Vol.131; no.18.-P.
4. Neuronal Death After Hemorrhagic Stroke In Vitro and In Vivo Shares Features of Ferroptosis and Necroptosis/ M. Zille, S.S. Karuppagounder, Y. Chen, et al.// *Stroke*.-2017.-Vol.48; no.4.-P.1033-1043.
5. Necroptosis: an alternative cell death program defending against cancer/ D. Chen, J. Yu, L. Zhang// *Biochim Biophys Acta*.-2016.-Vol.1865; no.2.-P.228-36.
6. "The NET Outcome": Are Neutrophil Extracellular Traps of Any Relevance to the Pathophysiology of Autoimmune Disorders in Childhood?/ S. Giaglis, S. Hahn, P. Hasler// *Front Pediatr*.-2016.-Vol.4; 97.
7. The anticancer peptide RT53 induces immunogenic cell death/ E. Pasquereau-Kotula, J. Habault, G. Kroemer, et al.// *PLoS One*.-2018.-Vol.13; no.8.-P.e0201220.
8. *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolates induce rapid, type III secretion-dependent, but ExoU-independent, oncosis of macrophages and polymorphonuclear neutrophils/ D. Dacheux, B. Toussaint, M. Richard, et al.// *Infect Immun*.-2000.-Vol.68; no.5.-P.2916-24.
9. Autophagy in cardiovascular disease/ W. Martinet, M.W. Knaapen, M.M. Kockx, et al.// *Trends Mol Med*.-2007.-Vol.13; no.11.-P.482-91.
10. Consecutive entosis stages in human substrate-dependent cultured cells/ A.S. Garanina, O.P. Kisurina-Evgenieva, M.V. Erokhina, et al.// *Sci Rep*.-2017.-Vol.7; no.1.-P.12555.
11. Ultraviolet irradiation-induced apoptosis does not trigger nuclear fragmentation but translocation of chromatin from nucleus into cytoplasm in the microglial cell-line, BV-2/ S. Zierler, B. Klein, T. Furtner, et al.// *Brain Res*.-2006.-Vol.1121; no.1.-P.12-21.
12. One enzyme, two functions: PON2 prevents mitochondrial superoxide formation and apoptosis independent from its lactonase activity/ S. Altenhofer, I. Witte, J.F. Teiber, et al.// *J Biol Chem*.-2010.-Vol.285; no.32.-P.24398-403.
13. Apoptosis-inducing factor (AIF): key to the conserved caspase-independent pathways of cell death?/ C. Cande, F. Cecconi, P. Dessen, et al.// *J Cell Sci*.-2002.-Vol.115; no.Pt 24.-P.4727-34.

14. Life with or without AIF/ E. Hangen, K. Blomgren, P. Benit, et al.// *Trends Biochem Sci.*-2010.-Vol.35; no.5.-P.278-87.
15. Paraoxonases 1, 2, and 3, oxidative stress, and macrophage foam cell formation during atherosclerosis development/ M. Aviram, M. Rosenblat// *Free Radic Biol Med.*-2004.-Vol.37; no.9.-P.1304-16.
16. No death without life: vital functions of apoptotic effectors/ L. Galluzzi, N. Joza, E. Tasdemir, et al.// *Cell Death Differ.*-2008.-Vol.15; no.7.-P.1113-23.
17. Mitochondria to nucleus translocation of AIF in mice lacking Hsp70 during ischemia/reperfusion/ S. Choudhury, S. Bae, Q. Ke, et al.// *Basic Res Cardiol.*-2011.-Vol.106; no.3.-P.397-407.
18. Poly(ADP-ribose) (PAR) binding to apoptosis-inducing factor is critical for PAR polymerase-1-dependent cell death (parthanatos)/ Y. Wang, N.S. Kim, J.F. Haince, et al.// *Sci Signal.*-2011.-Vol.4; no.167.-P.ra20.
19. Genetic analysis of the mammalian cell death machinery/ N. Joza, G. Kroemer, J.M. Penninger// *Trends Genet.*-2002.-Vol.18; no.3.-P.142-9.
20. Apoptosis inducing factor (AIF): a phylogenetically old, caspase-independent effector of cell death/ H.K. Lorenzo, S.A. Susin, J. Penninger, et al.// *Cell Death Differ.*-1999.-Vol.6; no.6.-P.516-24.
21. Mitochondrial regulation of cell death: processing of apoptosis-inducing factor (AIF)/ E. Norberg, S. Orrenius, B. Zhivotovsky// *Biochem Biophys Res Commun.*-2010.-Vol.396; no.1.-P.95-100.
22. Apoptosis-inducing factor: structure, function, and redox regulation/ I.F. Sevrioukova// *Antioxid Redox Signal.*-2011.-Vol.14; no.12.-P.2545-79.
23. Caspase-independent programmed cell death following ischemic stroke/ B.B. Cho, L.H. Toledo-Pereyra// *J Invest Surg.*-2008.-Vol.21; no.3.-P.141-7.
24. Therapeutic potential of AIF-mediated caspase-independent programmed cell death/ H.K. Lorenzo, S.A. Susin// *Drug Resist Updat.*-2007.-Vol.10; no.6.-P.235-55.
25. Apoptosis-inducing factor: vital and lethal/ N. Modjtahedi, F. Giordanetto, F. Madeo, et al.// *Trends Cell Biol.*-2006.-Vol.16; no.5.-P.264-72.
26. Mitochondrial release of apoptosis-inducing factor occurs downstream of cytochrome c release in response to several proapoptotic stimuli/ D. Arnoult, P. Parone, J.C. Martinou, et al.// *J Cell Biol.*-2002.-Vol.159; no.6.-P.923-9.
27. Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor/ S.W. Yu, H. Wang, M.F. Poitras, et al.// *Science.*-2002.-Vol.297; no.5579.-P.259-63.

28. Redox-linked conformational dynamics in apoptosis-inducing factor/ I.F. Sevrioukova// *J Mol Biol.*-2009.-Vol.390; no.5.-P.924-38.
29. AIF-mediated programmed necrosis: a highly regulated way to die/ H. Boujrad, O. Gubkina, N. Robert, et al.// *Cell Cycle.*-2007.-Vol.6; no.21.-P.2612-9.
30. Heat shock protein 70 binding inhibits the nuclear import of apoptosis-inducing factor/ S. Gurbuxani, E. Schmitt, C. Cande, et al.// *Oncogene.*-2003.-Vol.22; no.43.-P.6669-78.
31. AIF promotes chromatinolysis and caspase-independent programmed necrosis by interacting with histone H2AX/ C. Artus, H. Boujrad, A. Bouharrou, et al.// *EMBO J.*-2010.-Vol.29; no.9.-P.1585-99.
32. Changes of mitochondria and relocation of the apoptosis-inducing factor during apoptosis/ A.I. Scovassi, C. Soldani, P. Veneroni, et al.// *Ann N Y Acad Sci.*-2009.-Vol.1171; 12-7.
33. Histone H2AX: The missing link in AIF-mediated caspase-independent programmed necrosis/ M. Baritaud, H. Boujrad, H.K. Lorenzo, et al.// *Cell Cycle.*-2010.-Vol.9; no.16.-P.3166-73.
34. Mouse models of mitochondrial complex I dysfunction/ M.H. Irwin, K. Parameshwaran, C.A. Pinkert// *Int J Biochem Cell Biol.*-2013.-Vol.45; no.1.-P.34-40.
35. The harlequin mouse mutation downregulates apoptosis-inducing factor/ J.A. Klein, C.M. Longo-Guess, M.P. Rossmann, et al.// *Nature.*-2002.-Vol.419; no.6905.-P.367-74.
36. AIF, reactive oxygen species, and neurodegeneration: a "complex" problem/ B.M. Polster// *Neurochem Int.*-2013.-Vol.62; no.5.-P.695-702.
37. Reactive oxygen species regulation by AIF- and complex I-depleted brain mitochondria/ S.J. Chinta, A. Rane, N. Yadava, et al.// *Free Radic Biol Med.*-2009.-Vol.46; no.7.-P.939-47.
38. BCL-2 protein family. Essential regulators of cell death. Preface/ C. Hetz// *Adv Exp Med Biol.*-2010.-Vol.687; vii-viii.
39. Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-X(L) during apoptosis/ Y.T. Hsu, K.G. Wolter, R.J. Youle// *Proc Natl Acad Sci U S A.*-1997.-Vol.94; no.8.-P.3668-72.
40. Rapid induction of mitochondrial events and caspase-independent apoptosis in Survivin-targeted melanoma cells/ T. Liu, B. Brouha, D. Grossman// *Oncogene.*-2004.-Vol.23; no.1.-P.39-48.
41. Two kinds of BIR-containing protein - inhibitors of apoptosis, or required for mitosis/ J. Silke, D.L. Vaux// *J Cell Sci.*-2001.-Vol.114; no.Pt 10.-P.1821-7.
42. Reovirus-induced apoptosis requires mitochondrial release of Smac/DIABLO and involves reduction of cellular inhibitor of apoptosis protein levels/ D.J. Kominsky, R.J. Bickel, K.L. Tyler// *J Virol.*-2002.-Vol.76; no.22.-P.11414-24.

43. IAPs: what's in a name?/ S.M. Srinivasula, J.D. Ashwell// *Mol Cell*.-2008.-Vol.30; no.2.-P.123-35.
44. Human survivin is negatively regulated by wild-type p53 and participates in p53-dependent apoptotic pathway/ A. Mirza, M. McGuirk, T.N. Hockenberry, et al.// *Oncogene*.-2002.-Vol.21; no.17.-P.2613-22.
45. Survivin interacts with Smac/DIABLO in ovarian carcinoma cells but is redundant in Smac-mediated apoptosis/ I.A. McNeish, R. Lopes, S.J. Bell, et al.// *Exp Cell Res*.-2005.-Vol.302; no.1.-P.69-82.
46. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma/ G. Ambrosini, C. Adida, D.C. Altieri// *Nat Med*.-1997.-Vol.3; no.8.-P.917-21.
47. Solution structure of human survivin and its binding interface with Smac/Diablo/ C. Sun, D. Nettlesheim, Z. Liu, et al.// *Biochemistry*.-2005.-Vol.44; no.1.-P.11-7.
48. Crystal structure and mutagenic analysis of the inhibitor-of-apoptosis protein survivin/ S.W. Muchmore, J. Chen, C. Jakob, et al.// *Mol Cell*.-2000.-Vol.6; no.1.-P.173-82.
49. A single amino acid change (Asp 53 --> Ala53) converts Survivin from anti-apoptotic to pro-apoptotic/ Z. Song, S. Liu, H. He, et al.// *Mol Biol Cell*.-2004.-Vol.15; no.3.-P.1287-96.
50. Homodimerization antagonizes nuclear export of survivin/ D. Engelsma, J.A. Rodriguez, A. Fish, et al.// *Traffic*.-2007.-Vol.8; no.11.-P.1495-502.
51. Structure of a Survivin-Borealin-INCENP core complex reveals how chromosomal passengers travel together/ A.A. Jeyaprakash, U.R. Klein, D. Lindner, et al.// *Cell*.-2007.-Vol.131; no.2.-P.271-85.
52. Survivin, versatile modulation of cell division and apoptosis in cancer/ D.C. Altieri// *Oncogene*.-2003.-Vol.22; no.53.-P.8581-9.
53. Regulation of survivin stability by the aryl hydrocarbon receptor-interacting protein/ B.H. Kang, D.C. Altieri// *J Biol Chem*.-2006.-Vol.281; no.34.-P.24721-7.
54. Acetylation directs survivin nuclear localization to repress STAT3 oncogenic activity/ H. Wang, M.P. Holloway, L. Ma, et al.// *J Biol Chem*.-2010.-Vol.285; no.46.-P.36129-37.
55. The ubiquitin-proteasome pathway regulates survivin degradation in a cell cycle-dependent manner/ J. Zhao, T. Tenev, L.M. Martins, et al.// *J Cell Sci*.-2000.-Vol.113 Pt 23; 4363-71.
56. The case for survivin as a regulator of microtubule dynamics and cell-death decisions/ D.C. Altieri// *Curr Opin Cell Biol*.-2006.-Vol.18; no.6.-P.609-15.
57. Differential subcellular localization of functionally divergent survivin splice variants/ C. Mahotka, J. Liebmann, M. Wenzel, et al.// *Cell Death Differ*.-2002.-Vol.9; no.12.-P.1334-42.

58. Nuclear and cytoplasmic survivin: molecular mechanism, prognostic, and therapeutic potential/ R.H. Stauber, W. Mann, S.K. Knauer// *Cancer Res.*-2007.-Vol.67; no.13.-P.5999-6002.
59. Survivin exists in immunochemically distinct subcellular pools and is involved in spindle microtubule function/ P. Fortugno, N.R. Wall, A. Giodini, et al.// *J Cell Sci.*-2002.-Vol.115; no.Pt 3.-P.575-85.
60. Compartmentalized phosphorylation of IAP by protein kinase A regulates cytoprotection/ T. Dohi, F. Xia, D.C. Altieri// *Mol Cell.*-2007.-Vol.27; no.1.-P.17-28.
61. Survivin: a protein with dual roles in mitosis and apoptosis/ S.P. Wheatley, I.A. McNeish// *Int Rev Cytol.*-2005.-Vol.247; 35-88.
62. The Survivin-Crm1 interaction is essential for chromosomal passenger complex localization and function/ S.K. Knauer, C. Bier, N. Habtemichael, et al.// *EMBO Rep.*-2006.-Vol.7; no.12.-P.1259-65.
63. Survivin's dual role: an export's view/ S.K. Knauer, W. Mann, R.H. Stauber// *Cell Cycle.*-2007.-Vol.6; no.5.-P.518-21.
64. HBXIP functions as a cofactor of survivin in apoptosis suppression/ H. Marusawa, S. Matsuzawa, K. Welsh, et al.// *EMBO J.*-2003.-Vol.22; no.11.-P.2729-40.
65. Direct interaction between survivin and Smac/DIABLO is essential for the anti-apoptotic activity of survivin during taxol-induced apoptosis/ Z. Song, X. Yao, M. Wu// *J Biol Chem.*-2003.-Vol.278; no.25.-P.23130-40.
66. An IAP-IAP complex inhibits apoptosis/ T. Dohi, K. Okada, F. Xia, et al.// *J Biol Chem.*-2004.-Vol.279; no.33.-P.34087-90.
67. The survivin/Aurora B complex: its role in coordinating tension and attachment/ S.M. Lens, R.H. Medema// *Cell Cycle.*-2003.-Vol.2; no.6.-P.507-10.
68. Role of survivin phosphorylation by aurora B in mitosis/ M. Delacour-Larose, M.N. Thi, S. Dimitrov, et al.// *Cell Cycle.*-2007.-Vol.6; no.15.-P.1878-85.
69. Aurora B kinase exists in a complex with survivin and INCENP and its kinase activity is stimulated by survivin binding and phosphorylation/ M.A. Bolton, W. Lan, S.E. Powers, et al.// *Mol Biol Cell.*-2002.-Vol.13; no.9.-P.3064-77.
70. Aurora-kinase inhibitors as anticancer agents/ N. Keen, S. Taylor// *Nat Rev Cancer.*-2004.-Vol.4; no.12.-P.927-36.
71. Survivin modulates microtubule dynamics and nucleation throughout the cell cycle/ J. Rosa, P. Canovas, A. Islam, et al.// *Mol Biol Cell.*-2006.-Vol.17; no.3.-P.1483-93.

72. Aurora C is directly associated with Survivin and required for cytokinesis/ X. Yan, L. Cao, Q. Li, et al.// *Genes Cells*.-2005.-Vol.10; no.6.-P.617-26.
73. A survivin-ran complex regulates spindle formation in tumor cells/ F. Xia, P.M. Canovas, T.M. Guadagno, et al.// *Mol Cell Biol*.-2008.-Vol.28; no.17.-P.5299-311.
74. Caspase-mediated loss of mitochondrial function and generation of reactive oxygen species during apoptosis/ J.E. Ricci, R.A. Gottlieb, D.R. Green// *J Cell Biol*.-2003.-Vol.160; no.1.-P.65-75.
75. The late increase in intracellular free radical oxygen species during apoptosis is associated with cytochrome c release, caspase activation, and mitochondrial dysfunction/ Q. Chen, Y.C. Chai, S. Mazumder, et al.// *Cell Death Differ*.-2003.-Vol.10; no.3.-P.323-34.
76. Targeting mitochondrial reactive oxygen species as novel therapy for inflammatory diseases and cancers/ X. Li, P. Fang, J. Mai, et al.// *J Hematol Oncol*.-2013.-Vol.6; 19.
77. Clarifying the supercomplex: the higher-order organization of the mitochondrial electron transport chain/ J.A. Letts, L.A. Sazanov// *Nat Struct Mol Biol*.-2017.-Vol.24; no.10.-P.800-808.
78. Paraoxonase-2 (PON2) in brain and its potential role in neuroprotection/ L.G. Costa, R. de Laat, K. Dao, et al.// *Neurotoxicology*.-2014.-Vol.43; 3-9.
79. Paraoxonase-2 is a ubiquitously expressed protein with antioxidant properties and is capable of preventing cell-mediated oxidative modification of low density lipoprotein/ C.J. Ng, D.J. Wadleigh, A. Gangopadhyay, et al.// *J Biol Chem*.-2001.-Vol.276; no.48.-P.44444-9.
80. Breaking the chain at the membrane: paraoxonase 2 counteracts lipid peroxidation at the plasma membrane/ H. Hagmann, A. Kuczkowski, M. Ruehl, et al.// *FASEB J*.-2014.-Vol.28; no.4.-P.1769-79.
81. Paraoxonase-2 reduces oxidative stress in vascular cells and decreases endoplasmic reticulum stress-induced caspase activation/ S. Horke, I. Witte, P. Wilgenbus, et al.// *Circulation*.-2007.-Vol.115; no.15.-P.2055-64.
82. Paraoxonases are associated with intestinal inflammatory diseases and intracellularly localized to the endoplasmic reticulum/ L. Rothem, C. Hartman, A. Dahan, et al.// *Free Radic Biol Med*.-2007.-Vol.43; no.5.-P.730-9.
83. Paraoxonase 2 Facilitates Pancreatic Cancer Growth and Metastasis by Stimulating GLUT1-Mediated Glucose Transport/ A. Nagarajan, S.K. Dogra, L. Sun, et al.// *Mol Cell*.-2017.-Vol.67; no.4.-P.685-701 e6.
84. Exploring the role of paraoxonase-2 in bladder cancer: analyses performed on tissue samples, urines and cell cultures/ T. Bacchetti, D. Sartini, V. Pozzi, et al.// *Oncotarget*.-2017.-Vol.8; no.17.-P.28785-28795.

85. Valproic acid inhibits glioblastoma multiforme cell growth via paraoxonase 2 expression/ J.H. Tseng, C.Y. Chen, P.C. Chen, et al.// *Oncotarget*.-2017.-Vol.8; no.9.-P.14666-14679.
86. The anti-apoptotic PON2 protein is Wnt/beta-catenin-regulated and correlates with radiotherapy resistance in OSCC patients/ M. Kruger, J. Amort, P. Wilgenbus, et al.// *Oncotarget*.-2016.-Vol.7; no.32.-P.51082-51095.
87. Tissue transglutaminase serves as an inhibitor of apoptosis by cross-linking caspase 3 in thapsigargin-treated cells/ H. Yamaguchi, H.G. Wang// *Mol Cell Biol*.-2006.-Vol.26; no.2.-P.569-79.
88. Transglutaminases: nature's biological glues/ M. Griffin, R. Casadio, C.M. Bergamini// *Biochem J*.-2002.-Vol.368; no.Pt 2.-P.377-96.
89. Transglutaminase 2: a multi-tasking protein in the complex circuitry of inflammation and cancer/ K. Mehta, A. Kumar, H.I. Kim// *Biochem Pharmacol*.-2010.-Vol.80; no.12.-P.1921-9.
90. Evolutionary specialization of a tryptophan indole group for transition-state stabilization by eukaryotic transglutaminases/ S.E. Iismaa, S. Holman, M.A. Wouters, et al.// *Proc Natl Acad Sci U S A*.-2003.-Vol.100; no.22.-P.12636-41.
91. Phage display selection of efficient glutamine-donor substrate peptides for transglutaminase 2/ Z. Keresztessy, E. Csosz, J. Harsfalvi, et al.// *Protein Sci*.-2006.-Vol.15; no.11.-P.2466-80.
92. Structural aspects of transglutaminase 2: functional, structural, and regulatory diversity/ C.S. Lee, H.H. Park// *Apoptosis*.-2017.-Vol.22; no.9.-P.1057-1068.
93. Interaction of tissue transglutaminase with nuclear transport protein importin-alpha3/ X. Peng, Y. Zhang, H. Zhang, et al.// *FEBS Lett*.-1999.-Vol.446; no.1.-P.35-9.
94. Tissue transglutaminase is an essential participant in the epidermal growth factor-stimulated signaling pathway leading to cancer cell migration and invasion/ M.A. Antonyak, B. Li, A.D. Regan, et al.// *J Biol Chem*.-2009.-Vol.284; no.27.-P.17914-25.
95. Transglutaminase 2: a multi-functional protein in multiple subcellular compartments/ D. Park, S.S. Choi, K.S. Ha// *Amino Acids*.-2010.-Vol.39; no.3.-P.619-31.
96. Distinct nuclear localization and activity of tissue transglutaminase/ M. Lesort, K. Attanavanich, J. Zhang, et al.// *J Biol Chem*.-1998.-Vol.273; no.20.-P.11991-4.
97. The adenine nucleotide translocator 1 acts as a type 2 transglutaminase substrate: implications for mitochondrial-dependent apoptosis/ W. Malorni, M.G. Farrace, P. Matarrese, et al.// *Cell Death Differ*.-2009.-Vol.16; no.11.-P.1480-92.

98. Fluorometric assay for tissue transglutaminase-mediated transamidation activity/ C. Gnaccarini, W. Ben-Tahar, W.D. Lubell, et al.// *Bioorg Med Chem.*-2009.-Vol.17; no.17.-P.6354-9.
99. Spreading the word: non-autonomous effects of apoptosis during development, regeneration and disease/ A. Perez-Garijo, H. Steller// *Development.*-2015.-Vol.142; no.19.-P.3253-62.
100. Schwann cell to axon transfer of ribosomes: toward a novel understanding of the role of glia in the nervous system/ F.A. Court, W.T. Hendriks, H.D. MacGillavry, et al.// *J Neurosci.*-2008.-Vol.28; no.43.-P.11024-9.
101. Morphological evidence for a transport of ribosomes from Schwann cells to regenerating axons/ F.A. Court, R. Midha, B.A. Cisterna, et al.// *Glia.*-2011.-Vol.59; no.10.-P.1529-39.
102. Caspase 3-mediated stimulation of tumor cell repopulation during cancer radiotherapy/ Q. Huang, F. Li, X. Liu, et al.// *Nat Med.*-2011.-Vol.17; no.7.-P.860-6.
103. Therapy-induced tumour secretomes promote resistance and tumour progression/ A.C. Obenauf, Y. Zou, A.L. Ji, et al.// *Nature.*-2015.-Vol.520; no.7547.-P.368-72.
104. Dying tumor cells stimulate proliferation of living tumor cells via caspase-dependent protein kinase Cdelta activation in pancreatic ductal adenocarcinoma/ J. Cheng, L. Tian, J. Ma, et al.// *Mol Oncol.*-2015.-Vol.9; no.1.-P.105-14.
105. Prognostic factors for long-term survival after glioblastoma/ M.S. Walid// *Perm J.*-2008.-Vol.12; no.4.-P.45-8.
106. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma/ R. Stupp, W.P. Mason, M.J. van den Bent, et al.// *N Engl J Med.*-2005.-Vol.352; no.10.-P.987-96.
107. Spatiotemporal Evolution of the Primary Glioblastoma Genome/ J. Kim, I.H. Lee, H.J. Cho, et al.// *Cancer Cell.*-2015.-Vol.28; no.3.-P.318-28.
108. An epigenetic gateway to brain tumor cell identity/ S.C. Mack, C.G. Hubert, T.E. Miller, et al.// *Nat Neurosci.*-2016.-Vol.19; no.1.-P.10-9.
109. Acidic stress promotes a glioma stem cell phenotype/ A.B. Hjelmeland, Q. Wu, J.M. Heddleston, et al.// *Cell Death Differ.*-2011.-Vol.18; no.5.-P.829-40.
110. Mesenchymal glioma stem cells are maintained by activated glycolytic metabolism involving aldehyde dehydrogenase 1A3/ P. Mao, K. Joshi, J. Li, et al.// *Proc Natl Acad Sci U S A.*-2013.-Vol.110; no.21.-P.8644-9.

111. Tumor stem cells derived from glioblastomas cultured in bFGF and EGF more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumors than do serum-cultured cell lines/ J. Lee, S. Kotliarova, Y. Kotliarov, et al.// *Cancer Cell*.-2006.-Vol.9; no.5.-P.391-403.
112. Comprehensive, Integrative Genomic Analysis of Diffuse Lower-Grade Gliomas/ N. Cancer Genome Atlas Research, D.J. Brat, R.G. Verhaak, et al.// *N Engl J Med*.-2015.-Vol.372; no.26.-P.2481-98.
113. The definition of primary and secondary glioblastoma/ H. Ohgaki, P. Kleihues// *Clin Cancer Res*.-2013.-Vol.19; no.4.-P.764-72.
114. Hypoxia Induces Production of L-2-Hydroxyglutarate/ A.M. Intlekofer, R.G. Dematteo, S. Venneti, et al.// *Cell Metab*.-2015.-Vol.22; no.2.-P.304-11.
115. Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis/ H.S. Phillips, S. Kharbanda, R. Chen, et al.// *Cancer Cell*.-2006.-Vol.9; no.3.-P.157-73.
116. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1/ R.G. Verhaak, K.A. Hoadley, E. Purdom, et al.// *Cancer Cell*.-2010.-Vol.17; no.1.-P.98-110.
117. Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma/ A.P. Patel, I. Tirosh, J.J. Trombetta, et al.// *Science*.-2014.-Vol.344; no.6190.-P.1396-401.
118. Most human non-GCIMP glioblastoma subtypes evolve from a common proneural-like precursor glioma/ T. Ozawa, M. Riester, Y.K. Cheng, et al.// *Cancer Cell*.-2014.-Vol.26; no.2.-P.288-300.
119. In vivo radiation response of proneural glioma characterized by protective p53 transcriptional program and proneural-mesenchymal shift/ J. Halliday, K. Helmy, S.S. Pattwell, et al.// *Proc Natl Acad Sci U S A*.-2014.-Vol.111; no.14.-P.5248-53.
120. Role of extracellular vesicles in glioma progression/ C. Quezada, A. Torres, I. Niechi, et al.// *Mol Aspects Med*.-2018.-Vol.60; 38-51.
121. Extracellular Vesicles in Glioblastoma: Role in Biological Processes and in Therapeutic Applications/ I. Giusti, M. Di Francesco, V. Dolo// *Curr Cancer Drug Targets*.-2017.-Vol.17; no.3.-P.221-235.
122. Sumoylated hnRNP A2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific motifs/ C. Villarroya-Beltri, C. Gutierrez-Vazquez, F. Sanchez-Cabo, et al.// *Nat Commun*.-2013.-Vol.4; 2980.

123. Biogenesis of extracellular vesicles (EV): exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies/ J.C. Akers, D. Gonda, R. Kim, et al.// *J Neurooncol.*-2013.-Vol.113; no.1.-P.1-11.
124. [Catalytic sites of medicinal leech enzyme destabilase-lysozyme (Mld). Structure-functional correlation]/ L.L. Zavalova, N.V. Antipova, I. Fadeeva Iu, et al.// *Bioorg Khim.*-2012.-Vol.38; no.2.-P.229-33.
125. In Situ Proximity Ligation Assay (PLA) Analysis of Protein Complexes Formed Between Golgi-Resident, Glycosylation-Related Transporters and Transferases in Adherent Mammalian Cell Cultures/ D. Maszczak-Seneczko, P. Sosicka, T. Olczak, et al.// *Methods Mol Biol.*-2016.-Vol.1496; 133-43.
126. Induction of autophagy promotes fusion of multivesicular bodies with autophagic vacuoles in k562 cells/ C.M. Fader, D. Sanchez, M. Furlan, et al.// *Traffic.*-2008.-Vol.9; no.2.-P.230-50.
127. Microfabricated mimics of in vivo structural cues for the study of guided tumor cell migration/ D. Gallego-Perez, N. Higueta-Castro, L. Denning, et al.// *Lab Chip.*-2012.-Vol.12; no.21.-P.4424-32.
128. Outer mitochondrial membrane localization of apoptosis-inducing factor: mechanistic implications for release/ S.W. Yu, Y. Wang, D.S. Frydenlund, et al.// *ASN Neuro.*-2009.-Vol.1; no.5.-P.
129. Mortalin-mediated and ERK-controlled targeting of HIF-1alpha to mitochondria confers resistance to apoptosis under hypoxia/ I. Mylonis, M. Kourti, M. Samiotaki, et al.// *J Cell Sci.*-2017.-Vol.130; no.2.-P.466-479.
130. Mortalin, apoptosis, and neurodegeneration/ C. Londono, C. Osorio, V. Gama, et al.// *Biomolecules.*-2012.-Vol.2; no.1.-P.143-64.
131. Apoptosis-inducing factor is a target for ubiquitination through interaction with XIAP/ J.C. Wilkinson, A.S. Wilkinson, S. Galban, et al.// *Mol Cell Biol.*-2008.-Vol.28; no.1.-P.237-47.
132. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action/ S. Dasari, P.B. Tchounwou// *Eur J Pharmacol.*-2014.-Vol.740; 364-78.
133. Identification of Novel Interaction Partners of AIF Protein on the Outer Mitochondrial Membrane/ N.P. Fadeeva, N.V. Antipova, V.O. Shender, et al.// *Acta Naturae.*-2018.-Vol.10; no.5.-P.58-67.
134. Crystal structure of human survivin reveals a bow tie-shaped dimer with two unusual alpha-helical extensions/ L. Chantalat, D.A. Skoufias, J.P. Kleman, et al.// *Mol Cell.*-2000.-Vol.6; no.1.-P.183-9.
135. The role of survivin in the resistance of endometriotic stromal cells to drug-induced apoptosis/ A. Watanabe, F. Taniguchi, M. Izawa, et al.// *Hum Reprod.*-2009.-Vol.24; no.12.-P.3172-9.
136. Critical role for hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel 2 in the AIF-mediated apoptosis/ E. Norberg, M. Karlsson, O. Korenovska, et al.// *EMBO J.*-2010.-Vol.29; no.22.-P.3869-78.

137. Survivin counteracts the therapeutic effect of microtubule de-stabilizers by stabilizing tubulin polymers/ C.H. Cheung, H.H. Chen, C.C. Kuo, et al.// *Mol Cancer*.-2009.-Vol.8; 43.
138. Survivin monomer plays an essential role in apoptosis regulation/ M.S. Pavlyukov, N.V. Antipova, M.V. Balashova, et al.// *J Biol Chem*.-2011.-Vol.286; no.26.-P.23296-307.
139. Survivin as a therapeutic target in Sonic hedgehog-driven medulloblastoma/ S.N. Brun, S.L. Markant, L.A. Esparza, et al.// *Oncogene*.-2015.-Vol.34; no.29.-P.3770-9.
140. Pseudopalisades in glioblastoma are hypoxic, express extracellular matrix proteases, and are formed by an actively migrating cell population/ D.J. Brat, A.A. Castellano-Sanchez, S.B. Hunter, et al.// *Cancer Res*.-2004.-Vol.64; no.3.-P.920-7.
141. Nucleocytoplasmic protein transport and recycling of Ran/ Y. Yoneda, M. Hieda, E. Nagoshi, et al.// *Cell Struct Funct*.-1999.-Vol.24; no.6.-P.425-33.
142. Expression and Intracellular Localization of Paraoxonase 2 in Different Types of Malignancies/ M.I. Shakhparonov, N.V. Antipova, V.O. Shender, et al.// *Acta Naturae*.-2018.-Vol.10; no.3.-P.92-99.
143. Placental expression level of the PON1, PON2, and PON3 genes in patients with uncomplicated pregnancy and preeclampsia/ N.V. Antipova, S.A. Levakov, N.A. Sheshukova, et al.// *Akush Ginekol (Mosk)*.-2018.-Vol.7; 40-44.
144. Protein transamidation by transglutaminase 2 in cells: a disputed Ca²⁺-dependent action of a multifunctional protein/ R. Kiraly, M. Demeny, L. Fesus// *FEBS J*.-2011.-Vol.278; no.24.-P.4717-39.
145. Transglutaminase 2 undergoes a large conformational change upon activation/ D.M. Pinkas, P. Strop, A.T. Brunger, et al.// *PLoS Biol*.-2007.-Vol.5; no.12.-P.e327.
146. Nanoscopic optical rulers beyond the FRET distance limit: fundamentals and applications/ P.C. Ray, Z. Fan, R.A. Crouch, et al.// *Chem Soc Rev*.-2014.-Vol.43; no.17.-P.6370-404.
147. Implications of tissue transglutaminase expression in malignant melanoma/ J.Y. Fok, S. Ekmekcioglu, K. Mehta// *Mol Cancer Ther*.-2006.-Vol.5; no.6.-P.1493-503.
148. Degradation of transglutaminase 2 by calcium-mediated ubiquitination responding to high oxidative stress/ E.M. Jeong, C.W. Kim, S.Y. Cho, et al.// *FEBS Lett*.-2009.-Vol.583; no.4.-P.648-54.
149. Detection of Transglutaminase 2 conformational changes in living cell/ M.S. Pavlyukov, N.V. Antipova, M.V. Balashova, et al.// *Biochem Biophys Res Commun*.-2012.-Vol.421; no.4.-P.773-9.
150. Meeting the challenge of ascites in ovarian cancer: new avenues for therapy and research/ E. Kipps, D.S. Tan, S.B. Kaye// *Nat Rev Cancer*.-2013.-Vol.13; no.4.-P.273-82.

151. The human plasma proteome: a nonredundant list developed by combination of four separate sources/ N.L. Anderson, M. Polanski, R. Pieper, et al.// *Mol Cell Proteomics*.-2004.-Vol.3; no.4.-P.311-26.
152. A proteome resource of ovarian cancer ascites: integrated proteomic and bioinformatic analyses to identify putative biomarkers/ L. Gortzak-Uzan, A. Ignatchenko, A.I. Evangelou, et al.// *J Proteome Res*.-2008.-Vol.7; no.1.-P.339-51.
153. Combinatorial peptide libraries facilitate development of multiple reaction monitoring assays for low-abundance proteins/ A.P. Drabovich, E.P. Diamandis// *J Proteome Res*.-2010.-Vol.9; no.3.-P.1236-45.
154. In-depth proteomics of ovarian cancer ascites: combining shotgun proteomics and selected reaction monitoring mass spectrometry/ S. Elschenbroich, V. Ignatchenko, B. Clarke, et al.// *J Proteome Res*.-2011.-Vol.10; no.5.-P.2286-99.
155. U1 snRNP protects pre-mRNAs from premature cleavage and polyadenylation/ D. Kaida, M.G. Berg, I. Younis, et al.// *Nature*.-2010.-Vol.468; no.7324.-P.664-8.
156. Autoantibody signatures involving glycolysis and spliceosome proteins precede a diagnosis of breast cancer among postmenopausal women/ J.J. Ladd, T. Chao, M.M. Johnson, et al.// *Cancer Res*.-2013.-Vol.73; no.5.-P.1502-13.
157. Apoptosis drives cancer cells proliferate and metastasize/ R.A. Wang, Q.L. Li, Z.S. Li, et al.// *J Cell Mol Med*.-2013.-Vol.17; no.1.-P.205-11.
158. Exosomal Markers (CD63 and CD9) Expression Pattern Using Immunohistochemistry in Resected Malignant and Nonmalignant Pancreatic Specimens/ M. Khushman, A. Bhardwaj, G.K. Patel, et al.// *Pancreas*.-2017.-Vol.46; no.6.-P.782-788.
159. MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer/ D.D. Taylor, C. Gercel-Taylor// *Gynecol Oncol*.-2008.-Vol.110; no.1.-P.13-21.
160. Proteome-metabolome profiling of ovarian cancer ascites reveals novel components involved in intercellular communication/ V.O. Shender, M.S. Pavlyukov, R.H. Ziganshin, et al.// *Mol Cell Proteomics*.-2014.-Vol.13; no.12.-P.3558-71.
161. The Role of Intercellular Communication in Cancer Progression/ V.O. Shender, G.P. Arapidi, M.S. Pavlyukov, et al.// *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*.-2018.-Vol.44; no.5.-P.473–480.
162. Cells release subpopulations of exosomes with distinct molecular and biological properties/ E. Willms, H.J. Johansson, I. Mager, et al.// *Sci Rep*.-2016.-Vol.6; 22519.

163. Functional splicing network reveals extensive regulatory potential of the core spliceosomal machinery/ P. Papasaikas, J.R. Tejedor, L. Vigevani, et al.// *Mol Cell*.-2015.-Vol.57; no.1.-P.7-22.
164. Evolution of SR protein and hnRNP splicing regulatory factors/ A. Busch, K.J. Hertel// *Wiley Interdiscip Rev RNA*.-2012.-Vol.3; no.1.-P.1-12.
165. In vivo assembly of functional U7 snRNP requires RNA backbone flexibility within the Sm-binding site/ N.G. Kolev, J.A. Steitz// *Nat Struct Mol Biol*.-2006.-Vol.13; no.4.-P.347-53.
166. Involvement of nuclear import and export factors in U8 box C/D snoRNP biogenesis/ N.J. Watkins, I. Lemm, R. Luhrmann// *Mol Cell Biol*.-2007.-Vol.27; no.20.-P.7018-27.
167. Cervical squamous cell carcinoma-secreted exosomal miR-221-3p promotes lymphangiogenesis and lymphatic metastasis by targeting VASH1/ C.F. Zhou, J. Ma, L. Huang, et al.// *Oncogene*.-2018.-Vol.
168. The DEK nuclear autoantigen is a secreted chemotactic factor/ N. Mor-Vaknin, A. Punturieri, K. Sitwala, et al.// *Mol Cell Biol*.-2006.-Vol.26; no.24.-P.9484-96.
169. Genotoxic stress causes the accumulation of the splicing regulator Sam68 in nuclear foci of transcriptionally active chromatin/ R. Busa, R. Geremia, C. Sette// *Nucleic Acids Res*.-2010.-Vol.38; no.9.-P.3005-18.
170. Tyrosine dephosphorylation of H2AX modulates apoptosis and survival decisions/ P.J. Cook, B.G. Ju, F. Telese, et al.// *Nature*.-2009.-Vol.458; no.7238.-P.591-6.
171. Plasma membrane and nuclear envelope integrity during the blebbing stage of apoptosis: a time-lapse study/ R. Andrade, L. Crisol, R. Prado, et al.// *Biol Cell*.-2009.-Vol.102; no.1.-P.25-35.
172. The novel SAR-binding domain of scaffold attachment factor A (SAF-A) is a target in apoptotic nuclear breakdown/ F. Gohring, B.L. Schwab, P. Nicotera, et al.// *EMBO J*.-1997.-Vol.16; no.24.-P.7361-71.
173. Mesenchymal differentiation mediated by NF-kappaB promotes radiation resistance in glioblastoma/ K.P.L. Bhat, V. Balasubramaniyan, B. Vaillant, et al.// *Cancer Cell*.-2013.-Vol.24; no.3.-P.331-46.
174. Determination of a Comprehensive Alternative Splicing Regulatory Network and Combinatorial Regulation by Key Factors during the Epithelial-to-Mesenchymal Transition/ Y. Yang, J.W. Park, T.W. Bebee, et al.// *Mol Cell Biol*.-2016.-Vol.36; no.11.-P.1704-19.
175. An EMT-driven alternative splicing program occurs in human breast cancer and modulates cellular phenotype/ I.M. Shapiro, A.W. Cheng, N.C. Flytzanis, et al.// *PLoS Genet*.-2011.-Vol.7; no.8.-P.e1002218.

176. RBFOX2 is an important regulator of mesenchymal tissue-specific splicing in both normal and cancer tissues/ J.P. Venables, J.P. Brosseau, G. Gadea, et al.// *Mol Cell Biol.*-2013.-Vol.33; no.2.-P.396-405.
177. EMT and stemness: flexible processes tuned by alternative splicing in development and cancer progression/ D. Pradella, C. Naro, C. Sette, et al.// *Mol Cancer.*-2017.-Vol.16; no.1.-P.8.
178. The spliceosome as a target of novel antitumour drugs/ S. Bonnal, L. Vigevani, J. Valcarcel// *Nat Rev Drug Discov.*-2012.-Vol.11; no.11.-P.847-59.
179. The 20S proteasome core, active within apoptotic exosome-like vesicles, induces autoantibody production and accelerates rejection/ M. Dieude, C. Bell, J. Turgeon, et al.// *Sci Transl Med.*-2015.-Vol.7; no.318.-P.318ra200.
180. Techniques to monitor glycolysis/ T. TeSlaa, M.A. Teitell// *Methods Enzymol.*-2014.-Vol.542; 91-114.
181. Ras-mediated modulation of pyruvate dehydrogenase activity regulates mitochondrial reserve capacity and contributes to glioblastoma tumorigenesis/ A. Prabhu, B. Sarcar, C.R. Miller, et al.// *Neuro Oncol.*-2015.-Vol.17; no.9.-P.1220-30.
182. EGF induces epithelial-mesenchymal transition and cancer stem-like cell properties in human oral cancer cells via promoting Warburg effect/ Q. Xu, Q. Zhang, Y. Ishida, et al.// *Oncotarget.*-2017.-Vol.8; no.6.-P.9557-9571.
183. The RNA recognition motif protein RBM11 is a novel tissue-specific splicing regulator/ S. Pedrotti, R. Busa, C. Compagnucci, et al.// *Nucleic Acids Res.*-2012.-Vol.40; no.3.-P.1021-32.
184. Regulation of alternative splicing by the core spliceosomal machinery/ A.L. Saltzman, Q. Pan, B.J. Blencowe// *Genes Dev.*-2011.-Vol.25; no.4.-P.373-84.
185. Oxidative stress-induced alternative splicing of transformer 2beta (SFRS10) and CD44 pre-mRNAs in gastric epithelial cells/ K. Takeo, T. Kawai, K. Nishida, et al.// *Am J Physiol Cell Physiol.*-2009.-Vol.297; no.2.-P.C330-8.
186. Nonsense-mediated mRNA decay in humans at a glance/ T. Kurosaki, L.E. Maquat// *J Cell Sci.*-2016.-Vol.129; no.3.-P.461-7.
187. MDM4 (MDMX) and its Transcript Variants/ F. Mancini, G. Di Conza, F. Moretti// *Curr Genomics.*-2009.-Vol.10; no.1.-P.42-50.
188. Alternative cyclin D1 splice forms differentially regulate the DNA damage response/ Z. Li, X. Jiao, C. Wang, et al.// *Cancer Res.*-2010.-Vol.70; no.21.-P.8802-11.

189. Prp8 protein: at the heart of the spliceosome/ R.J. Grainger, J.D. Beggs// *RNA*.-2005.-Vol.11; no.5.-P.533-57.
190. Apoptotic Cell-Derived Extracellular Vesicles Promote Malignancy of Glioblastoma Via Intercellular Transfer of Splicing Factors/ M.S. Pavlyukov, H. Yu, S. Bastola, et al.// *Cancer Cell*.-2018.-Vol.34; no.1.-P.119-135 e10.
191. Nucleotide Modifications Decrease Innate Immune Response Induced by Synthetic Analogs of snRNAs and snoRNAs/ G. Stepanov, E. Zhuravlev, V. Shender, et al.// *Genes (Basel)*.-2018.-Vol.9; no.11.-P.
192. Phenotypic Plasticity of Invasive Edge Glioma Stem-like Cells in Response to Ionizing Radiation/ M. Minata, A. Audia, J. Shi, et al.// *Cell Rep*.-2019.-Vol.26;-P.1893-1905.
193. Glioblastoma stem-like cells: at the root of tumor recurrence and a therapeutic target/ M. Jackson, F. Hassiotou, A. Nowak// *Carcinogenesis*.-2015.-Vol.36; no.2.-P.177-85.
194. Expanding the number of 'druggable' targets: non-enzymes and protein-protein interactions/ L.N. Makley, J.E. Gestwicki// *Chem Biol Drug Des*.-2013.-Vol.81; no.1.-P.22-32.
195. 5-Aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy can target human glioma stem-like cells refractory to antineoplastic agents/ T. Fujishiro, N. Nonoguchi, M. Pavliukov, et al.// *Photodiagnosis Photodyn Ther*.-2018.-Vol.24; 58-68.
196. The centrosomal kinase NEK2 is a novel splicing factor kinase involved in cell survival/ C. Naro, F. Barbagallo, P. Chieffi, et al.// *Nucleic Acids Res*.-2014.-Vol.42; no.5.-P.3218-27.
197. Glioblastoma Stem Cells Respond to Differentiation Cues but Fail to Undergo Commitment and Terminal Cell-Cycle Arrest/ H. Caren, S.H. Stricker, H. Bulstrode, et al.// *Stem Cell Reports*.-2015.-Vol.5; no.5.-P.829-842.
198. Eyes wide open: a critical review of sphere-formation as an assay for stem cells/ E. Pastrana, V. Silva-Vargas, F. Doetsch// *Cell Stem Cell*.-2011.-Vol.8; no.5.-P.486-98.
199. Targeting NEK2 attenuates glioblastoma growth and radioresistance by destabilizing histone methyltransferase EZH2/ J. Wang, P. Cheng, M.S. Pavlyukov, et al.// *J Clin Invest*.-2017.-Vol.127; no.8.-P.3075-3089.
200. Discovery of a novel small molecule binding site of human survivin/ M.D. Wendt, C. Sun, A. Kunzer, et al.// *Bioorg Med Chem Lett*.-2007.-Vol.17; no.11.-P.3122-9.
201. Birinapant (TL32711), a bivalent SMAC mimetic, targets TRAF2-associated cIAPs, abrogates TNF-induced NF-kappaB activation, and is active in patient-derived xenograft models/ C.A. Benetatos, Y. Mitsuuchi, J.M. Burns, et al.// *Mol Cancer Ther*.-2014.-Vol.13; no.4.-P.867-79.

202. Identification of a small-molecule inhibitor of the interaction between Survivin and Smac/DIABLO/ T. Oikawa, Y. Unno, K. Matsuno, et al.// *Biochem Biophys Res Commun.*-2010.-Vol.393; no.2.-P.253-8.
203. Impairment of glioma stem cell survival and growth by a novel inhibitor for Survivin-Ran protein complex/ H. Guvenc, M.S. Pavlyukov, K. Joshi, et al.// *Clin Cancer Res.*-2013.-Vol.19; no.3.-P.631-42.
204. Synthesis of potential antidipsotropic isoflavones: inhibitors of the mitochondrial monoamine oxidase-aldehyde dehydrogenase pathway/ G.Y. Gao, D.J. Li, W.M. Keung// *J Med Chem.*-2001.-Vol.44; no.20.-P.3320-8.
205. FOXD1-ALDH1A3 Signaling Is a Determinant for the Self-Renewal and Tumorigenicity of Mesenchymal Glioma Stem Cells/ P. Cheng, J. Wang, I. Waghmare, et al.// *Cancer Res.*-2016.-Vol.76; no.24.-P.7219-7230.
206. ABC Transporters in Cancer Stem Cells: Beyond Chemoresistance/ R.R. Begicevic, M. Falasca// *Int J Mol Sci.*-2017.-Vol.18; no.11.-P.
207. TOF-SIMS in cosmochemistry/ T. Stephan// *Planetary and Space Science.*-2001.-Vol.49; no.9.-P.859-906.
208. Biological tissue sample preparation for time-of-flight secondary ion mass spectrometry (ToF-SIMS) imaging/ S. Yoon, T.G. Lee// *Nano Converg.*-2018.-Vol.5; no.1.-P.24.
209. Visualization of the spatial distribution of Pt⁺ ions in cisplatin-treated glioblastoma cells by time-of-flight secondary ion mass spectrometry/ A.A. Gulin, M.S. Pavlyukov, S.K. Gularyan, et al.// *Biochemistry (Moscow) Supplement Series A: Membrane and Cell Biology.*-2015.-Vol.9; no.3.-P. 202–209
210. Applicability of TOF-SIMS for the assessment of lipid composition of cell membrane structures/ A.A. Gulin, M.S. Pavlyukov, S.A. Gusev, et al.// *Biochemistry (Moscow), Supplement Series A: Membrane and Cell Biology.*-2017.-Vol.11; no.2.-P.144–150.
211. Lateral Heterogeneity of Cholesterol Distribution in Cell Plasma Membrane: Investigation by Microfluorimetry, Immunofluorescence, and TOF-SIMS/ M.S. Pavlyukov, A.A. Gulin, A.A. Astafiev, et al.// *Biochemistry (Moscow) Supplement Series A: Membrane and Cell Biology.*-2019.-Vol.13; no.1.-P.50-57.
212. A possible role of sphingosine in induction of apoptosis by tumor necrosis factor-alpha in human neutrophils/ H. Ohta, Y. Yatomi, E.A. Sweeney, et al.// *FEBS Lett.*-1994.-Vol.355; no.3.-P.267-70.
213. Metabolic Imaging of Glutamine in Cancer/ L. Zhu, K. Ploessl, R. Zhou, et al.// *J Nucl Med.*-2017.-Vol.58; no.4.-P.533-537.

214. Age-specific signatures of glioblastoma at the genomic, genetic, and epigenetic levels/ S. Bozdag, A. Li, G. Riddick, et al.// PLoS One.-2013.-Vol.8; no.4.-P.e62982.
215. Active membrane cholesterol as a physiological effector/ Y. Lange, T.L. Steck// Chem Phys Lipids.-2016.-Vol.199; 74-93.
216. Loss-of-function screens of druggable targetome against cancer stem-like cells/ M. Song, H. Lee, M.H. Nam, et al.// FASEB J.-2017.-Vol.31; no.2.-P.625-635.

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаю искреннюю благодарность своему научному консультанту и учителю Шахпаронову Михаилу Ивановичу за безграничную помощь и поддержку в течение последних 10 лет, а также за возможность перенимать у него бесценный опыт проведения научных исследований.

Благодарю своих друзей – весь коллектив лаборатории мембранных биоэнергетических систем и группы кросс сшивающих ферментов за доброе отношение и замечательную рабочую обстановку.

Благодарю всех коллабораторов, без участия которых эта работа не могла бы состояться. В особенности Шендер Викторию Олеговну, Ануфриеву Ксению Сергеевну и Цзя Ванга за незаменимые советы, терпение и плодотворное обсуждение полученных результатов.

Благодарю членов своей семьи и Светланушку за внимание и заботу!