

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

На правах рукописи

Семёнова Галина Владимировна

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

Специальность 03.01.03 – молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Москва - 2017

Работа выполнена в лаборатории молекулярной иммунологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН)

Научный руководитель:

Деев Сергей Михайлович, член-корреспондент РАН, доктор биологических наук, профессор

Официальные оппоненты:

Прасолов Владимир Сергеевич, доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории клеточных основ развития злокачественных заболеваний Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной биологии им. В.А.Энгельгардта Российской академии наук

Казначеева Елена Валентиновна, доктор биологических наук, заведующая лабораторией ионных каналов клеточных мембран Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института цитологии Российской академии наук

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства.

Защита состоится «14» марта 2018 г. в 10 часов на заседании диссертационного совета Д 002.019.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Института биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова Российской академии наук по адресу: 117997, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д.16/10.

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

Автореферат разослан «___» _____ 20__ г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор физико-математических наук



В. А. Олейников

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

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

MPNST свойственна высокая генетическая и фенотипическая гетерогенность, агрессивный рост и устойчивость к классическим методам противоопухолевой терапии. В связи с этим в последнее десятилетие появился значительный интерес к поиску специфических маркеров MPNST, новых диагностических и прогностических критериев, а также возможностей направленной (адресной) терапии этих заболеваний. В качестве мишеней адресной терапии MPNST были предложены компоненты важнейших Ras-зависимых сигнальных путей MAPK/ERK и PI3K, а также компоненты канонического сигнального каскада Wnt. Активация этих каскадов была обнаружена в некоторых NF1-дефицитных клетках, клетках плексиформных нейрофибром и MPNST. Действительно, ингибиторы узловых сигнальных молекул в составе каскадов MAPK/ERK, PI3K и Wnt демонстрируют избирательную токсичность в отношении NF1-дефицитных клеток и MPNST, а их комбинации – синергичную токсичность. Такие комбинации, однако, вызывают ряд нежелательных побочных эффектов, и поиск новых мишеней адресной терапии MPNST остаётся актуальной задачей.

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

контролируют клеточную миграцию и инвазию опухолевых клеток, что может иметь большое значение для метастазирующих MPNST.

Уровни генной экспрессии, уровни белков и активность РАК в MPNST на сегодняшний день не были определены, однако, было обнаружено увеличение количества копий гена и мРНК *RAC1* – важнейшего регулятора активности РАК I-ой группы (РАК1/2/3). Установлено, что интродукция доминантно-негативного РАК1 подавляет Ras-зависимую трансформацию шванновских клеток. Эти данные позволяют предположить, что РАК I группы представляют собой перспективные мишени адресной терапии злокачественных опухолей оболочек периферических нервов. В настоящее время получено несколько специфических низкомолекулярных ингибиторов РАК1/2/3, которые могут быть использованы для индивидуальной или комбинационной терапии MPNST в доклинических испытаниях.

Цель работы: оценка значимости p21-активируемых киназ I группы (РАК1/2/3) в качестве потенциальных мишеней для терапии злокачественных опухолей оболочек периферических нервов (MPNST).

Задачи:

- 1) изучить взаимосвязь между молекулярными и клиничко-морфологическими характеристиками опухолей оболочек периферических нервов и уровнем фосфорилирования p21-активируемых киназ I группы (РАК1/2/3) в опухолевых тканях;
- 2) изучить влияние ингибиторов РАК1/2/3, а также генетического нокаута *РАК1/2/3* на пролиферативную и двигательную активность клеток злокачественных опухолей оболочек периферических нервов;
- 3) провести анализ изменения активности сигнальных каскадов MAPK/ERK, PI3K и Wnt, а также изменения уровней E- и N-кадгерина в клетках злокачественных опухолей оболочек периферических нервов в ответ на ингибирование РАК1/2/3 и выключение *РАК1/2/3*;
- 4) оценить эффект фармакологического ингибирования РАК1/2/3 на рост подкожных ксенографтных опухолей и экспериментальных лёгочных метастазов злокачественных опухолей оболочек периферических нервов *in vivo*;
- 5) провести анализ сочетанного воздействия низкомолекулярных ингибиторов РАК1/2/3 (Frax1036) и MEK1/2 (PD0325901) на рост злокачественных опухолей оболочек периферических нервов *in vitro* и *in vivo*.

Научная новизна

В данной работе была впервые изучена возможность использования РАК1/2/3 в качестве терапевтических мишеней MPNST. Впервые установлена взаимосвязь между активностью РАК1/2/3 в клетках опухолей оболочек периферических нервов и степенью злокачественности этих опухолей. Впервые изучены эффекты фармакологического ингибирования РАК1/2/3 и

генетического нокдауна *PAK1/2/3* на рост и распространение MPNST в моделях *in vitro* и *in vivo*. Впервые проведён анализ изменения внутриклеточной сигнализации клеток MPNST в ответ на выключение *PAK1/2/3*. Впервые был продемонстрирован синергический эффект комбинации ингибиторов киназ MEK1/2 и *PAK1/2/3* на рост и метастазирование MPNST.

Практическая значимость

Данные, полученные в работе, вносят вклад в понимание молекулярных механизмов роста и метастазирования злокачественных опухолей оболочек периферических нервов. Определение положения *PAK1/2/3* в цепи сигнальной трансдукции MPNST имеет фундаментальное значение для изучения роли p21-активируемых киназ в биологии опухолевых клеток.

Проведённые доклинические испытания ингибиторов *PAK1/2/3* в клеточных и мышечных моделях MPNST являются важным этапом на пути к разработке новых рациональных стратегий молекулярно-прицельной терапии этого заболевания. Обнаруженная взаимосвязь между активностью *PAK1/2/3* в клетках MPNST и чувствительностью этих клеток к выключению *PAK1/2/3* позволяют предложить фосфо-*PAK1/2/3* в качестве потенциального биомаркера для предсказания терапевтического ответа MPNST на воздействие ингибиторов *PAK1/2/3*. Предложенная схема сочетанной терапии ингибитором *PAK1/2/3* Frax1036 и ранее испытанным ингибитором MEK1/2 PD0325901 позволяет добиться устойчивого противоопухолевого эффекта. Эти данные могут служить предпосылкой новых клинических исследований для терапии опухолей оболочек периферических нервов.

Апробация работы

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

Структура диссертации

Диссертационная работа изложена на 124 страницах и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, выводов, списка цитируемой литературы, включающего 193 ссылки. Диссертация содержит 33 рисунка и 2 таблицы.

Публикации

По материалам работы опубликованы 4 статьи в рецензируемых журналах.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

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

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

Для того чтобы оценить возможный вклад протеинкиназ подсемейства РАК в патогенез нейрофибром и MPNST, в серии образцов тканей опухолей оболочек периферических нервов человека определяли активность р21-активируемых киназ I группы. В качестве показателя каталитической активности РАК1/2/3 использовали интенсивность фосфорилирования РАК1/2/3 по остаткам серина [S144/S141/S139]. Тканевые микроматрицы (tissue microarray, TMA), содержащие клинически охарактеризованные биообразцы, полученные из нормальных периферических нервов человека, доброкачественных опухолей оболочек периферических нервов (нейрофибром), первичных MPNST, рецидивных MPNST, а также метастазов MPNST, были иммуногистохимически окрашены на фосфо-РАК1/2/3 [S144/S141/S139]. (Рис. 1).

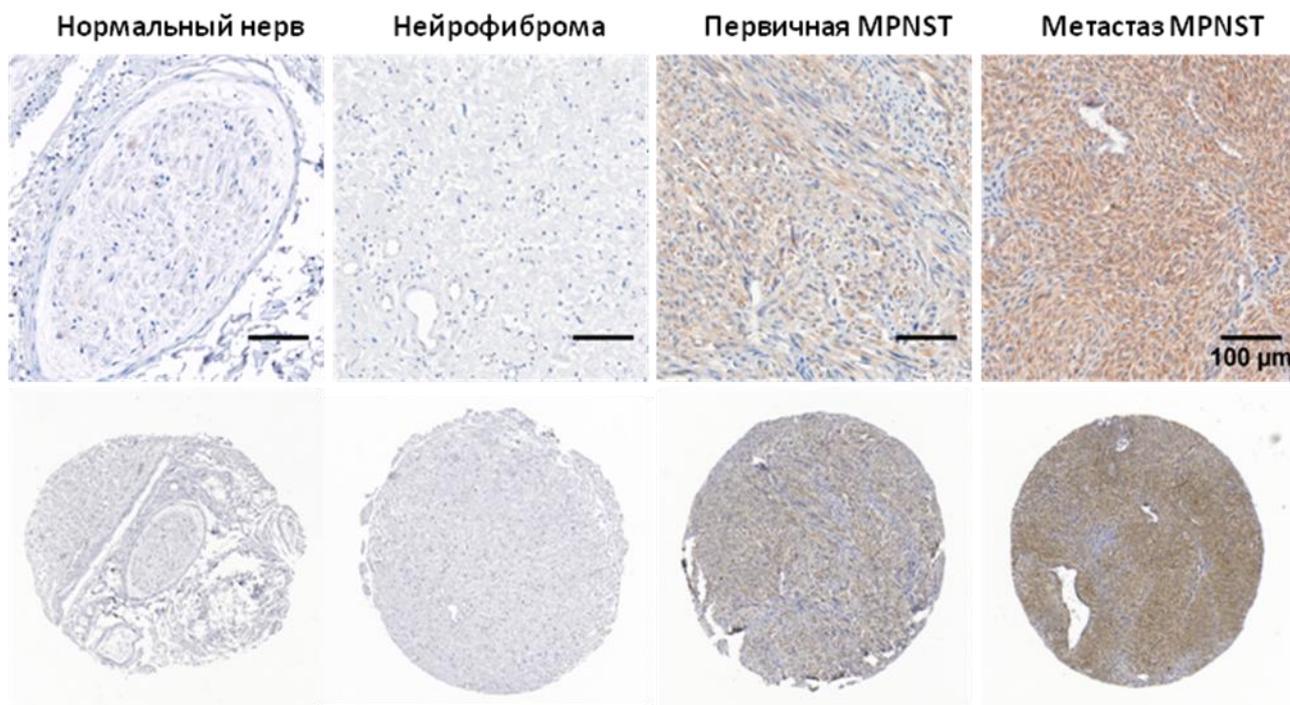


Рисунок 1. Репрезентативные фотографии образцов тканевых микроматриц (TMA), иммуногистохимически окрашенных антителами к фосфо-РАК1/2/3 [S144/S141/S139].

Между интенсивностью фосфорилирования РАК в тканях доброкачественных опухолей (нейрофибром) и тканях нормальных нервов не было обнаружено статистически значимой разницы, однако, уровень фосфо-

РАК1/2/3 был существенно увеличен в образцах MPNST. Кроме этого, метастатические MPNST показали значительно более высокий уровень фосфорилирования РАК1/2/3 по сравнению с первичными MPNST (Рис. 1).

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

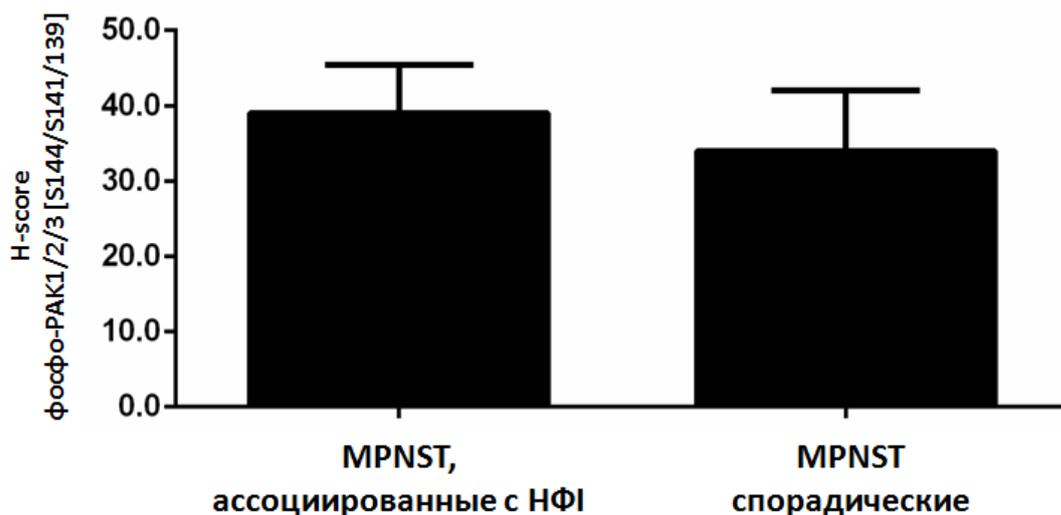


Рисунок 2. Анализ интенсивности иммуногистохимического окрашивания образцов спорадических (спонтанных) MPNST и MPNST у пациентов с НФИ на фосфо-РАК1/2/3 [S144/S141/S139].

Данные представлены в виде среднего значения и стандартного отклонения.

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

1.2. Измерение уровней белков и фосфо-белков РАК1/2/3 в клеточных линиях MPNST

Для последующих доклинических испытаний была собрана панель из семи клеточных линий НФИ-ассоциированных MPNST человека: S462TY, ST8814, sNF02.2, sNF96.2, sNF94.3, 90-8 и 88-3, а также клеток спорадической MPNST человека STS26T. В качестве контроля использовали первичные шванновские клетки человека (SC). В 7 из 8 линий MPNST был выявлен

повышенный уровень фосфорилирования PAK1/2/3 по сравнению с таковым в нормальных шванновских клетках человека (Рис. 3).

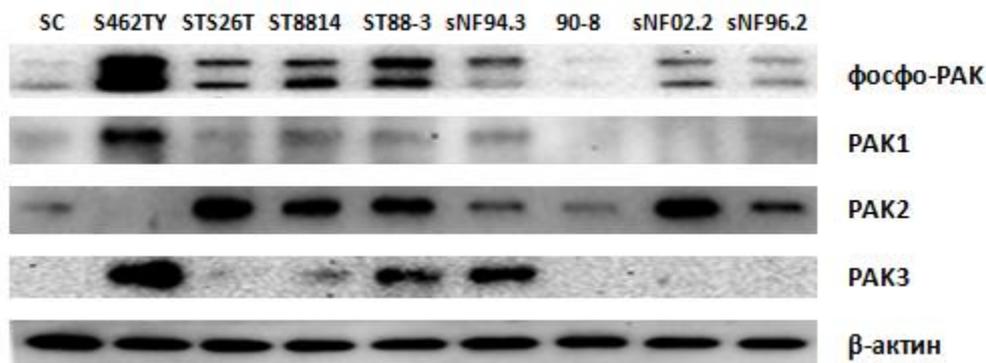


Рисунок 3. Вестерн-блот анализ уровня PAK1, PAK2, PAK3, фосфо-PAK1/2/3 в шванновских клетках и клетках MPNST человека.

Для дальнейших экспериментов *in vitro* были выбраны три клеточные линии с различными свойствами: S462TY – линия НФІ-ассоциированной MPNST с высоким уровнем фосфо-PAK1/2/3, STS26T – линия спорадической MPNST с уровнем фосфо-PAK1/2/3, сравнимым с уровнем в нормальных шванновских клетках, и ST8814 – линия НФІ-ассоциированной MPNST, демонстрирующая умеренное увеличение активности PAK1/2/3.

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

2.1. Ингибирование каталитической активности PAK1/2/3

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

В нашей работе для оценки функциональной значимости активации PAK в клетках MPNST были использованы ингибиторы двух разных групп: низкомолекулярный ингибитор PAK1/2/3 Frax1036 (Рис. 4) и пептидный ингибитор GST-PID.

GST-PID представляет собой полипептид, аминокислотная последовательность которого соответствует автоингибиторному домену PAK2 (PAK inhibitory domain, PID), меченный глутатионтрансферазой glutathione-S-transferase, GST). Продукция GST-PID эукариотическими клетками

обеспечивает связывание PID с каталитическим доменом эндогенных PAK1/2/3 и последующее ингибирование киназной активности этих белков.

Frax1036 - АТФ-конкурентный киназный ингибитор ряда пиридопиримидинов (Рис. 4А, Б), высокоспецифичный в отношении p21-активируемых киназ I группы (Рис. 4В). Frax1036 был ранее испытан в ряде доклинических исследований и продемонстрировал статистически значимый антипролиферативный эффект в отношении клеток опухолей мозга, яичников и молочной железы *in vitro* и *in vivo*.

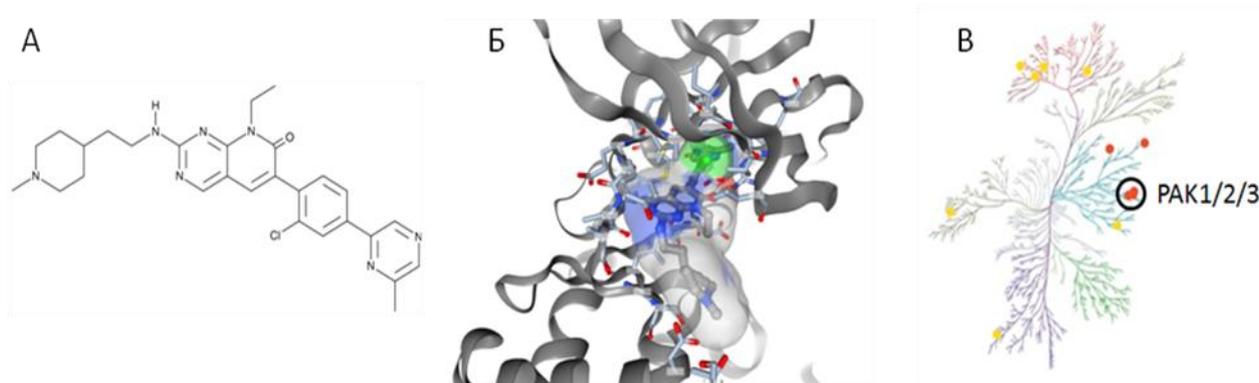


Рисунок 4. АТФ-конкурентный ингибитор PAK Frax1036.

А) Строение Frax1036

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

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

Применение двух селективных ингибиторов с различными механизмами действия позволяет отличать эффекты, связанные с ингибированием PAK1/2/3, от нецелевых эффектов Frax1036 и GST-PID в клеточных моделях MPNST. Для двух ингибиторов использовали два соответствующих контроля. Клетки, трансдуцированные pBMN-GST-PID, сравнивали с клетками, трансдуцированными «пустым» вектором pBMN-I-GFP. Для Frax1036 в моделях *in vitro* в качестве контроля использовали растворитель DMSO.

2.2. Влияние выключения PAK1/2/3 на рост и выживаемость клеток MPNST

Для того чтобы оценить зависимость клеточной пролиферации MPNST от внутриклеточной сигнализации, опосредованной PAK1/2/3, клетки трёх линий MPNST (S462TY, STS26T, ST8814), а также нормальные иммортализованные шванновские клетки человека (iHSC) инфицировали ретровирусом, кодирующим ингибитор PAK GST-PID (Рис. 5). GST-PID вызывал гибель клеток S462TY и снижал скорость роста клеток ST8814, оказывая, однако, незначительный эффект на пролиферативную активность клеток STS26T.

Контрольные шванновские клетки iHSC продемонстрировали устойчивость к GST-PID (Рис. 4).

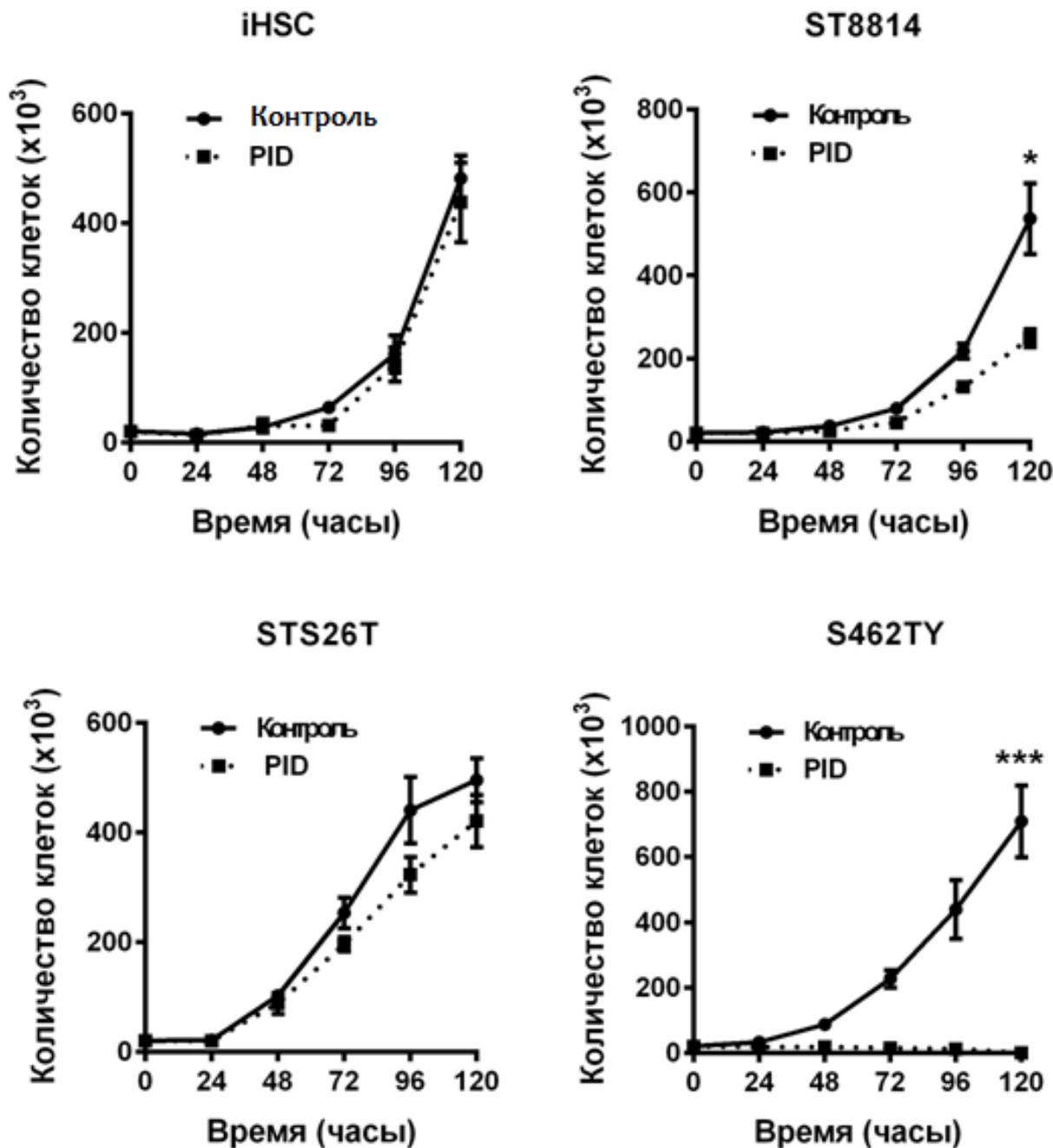


Рисунок 5. Влияние ингибитора РАК1/2/3 GST-PID на рост клеток трех линий MPNST и нормальных иммортализованных шванновских клеток iHSC.

Кривые роста клеток MPNST и iHSC, трансдуцированных pBMN-GST-PID (PID) или контрольным вектором pBMN-I-GFP (Контроль).

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

Для фармакологического ингибирования РАК1/2/3 клетки MPNST и iHSC экспонировали Frax1036 в концентрациях от 5 нМ до 10мкМ, в течение 72 ч.,

после чего строили кривые выживаемости (кривые доза/эффект) (Рис. 6А) и рассчитывали полумаксимальную концентрацию ингибирования (IC_{50}) для каждой клеточной линии (Рис 6Б).

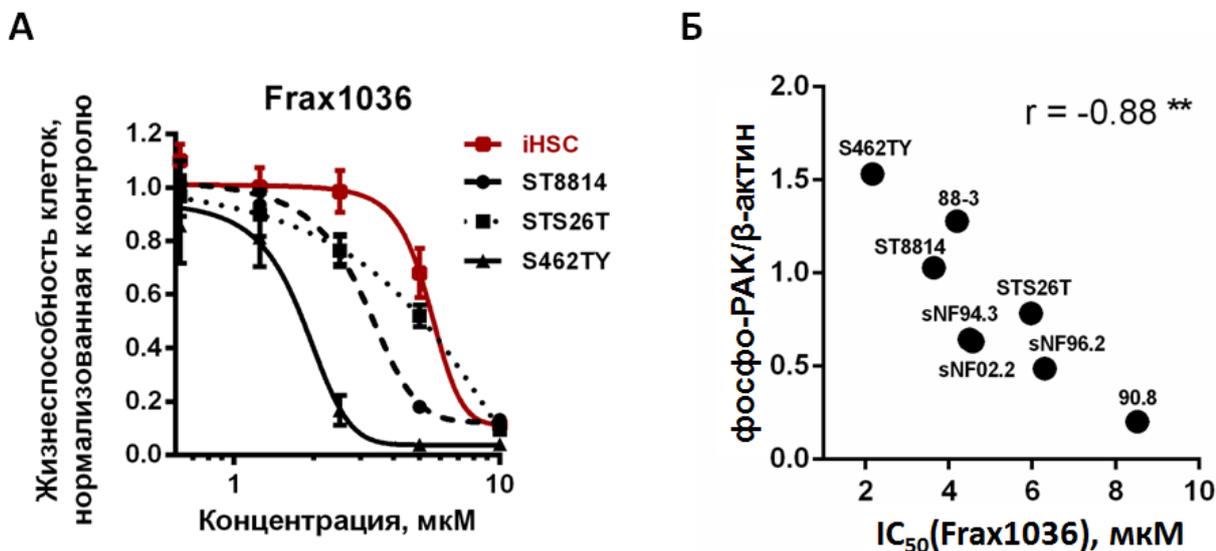


Рисунок 6. Влияние ингибитора PAK1/2/3 Frax1036 на рост клеток MPNST и iHSC.

А) Кривые доза/эффект для клеток MPNST и iHSC, экспонированных Frax1036. Эксперименты выполнены в трёх биологических повторах. Данные представлены в виде среднего значения и стандартного отклонения.

Б) Корреляционное поле $IC_{50}(\text{Frax1036})$ и уровня фосфо-РАК в клетках MPNST.

r – коэффициент Пирсона (**= $p < 0.01$).

Чувствительность к Frax1036 коррелировала с уровнем фосфо-РАК1/2/3 в этих клетках ($S462TY > ST8814 > STS26T$) (Рис. 6А). Остальные имеющиеся в наличии клетки MPNST (90-8, ST88-3, sNF02.2, sNF96.2 и sNF94.3) показали умеренную чувствительность к Frax1036 (Рис. 6Б), однако, эффект Frax1036 на клеточный рост подобным образом соотносился с уровнем фосфо-РАК1/2/3.

Для оценки корреляции между активностью PAK и чувствительностью к Frax1036 проводили количественный анализ данных иммуноблоттинга на фосфо-РАК1/2/3 в клетках MPNST (Рис. 3) и сопоставляли их со значениями $IC_{50}(\text{Frax1036})$ для этих клеток. Коэффициент Пирсона (r) оказался равным -0.88 ($p = 0.0042$), что соответствует обратной корреляции (Рис. 6Б).

В дополнение к ингибированию каталитической активности p21-активируемых киназ I группы, оценивали эффект их генетического нокдауна на пролиферацию клеток MPNST. Нокдаун PAK1/2/3 имел незначительный эффект на рост клеток STS26T и iHSC, однако, эффективно ингибировал пролиферацию клеток S462TY и ST8814 (Рис. 7).

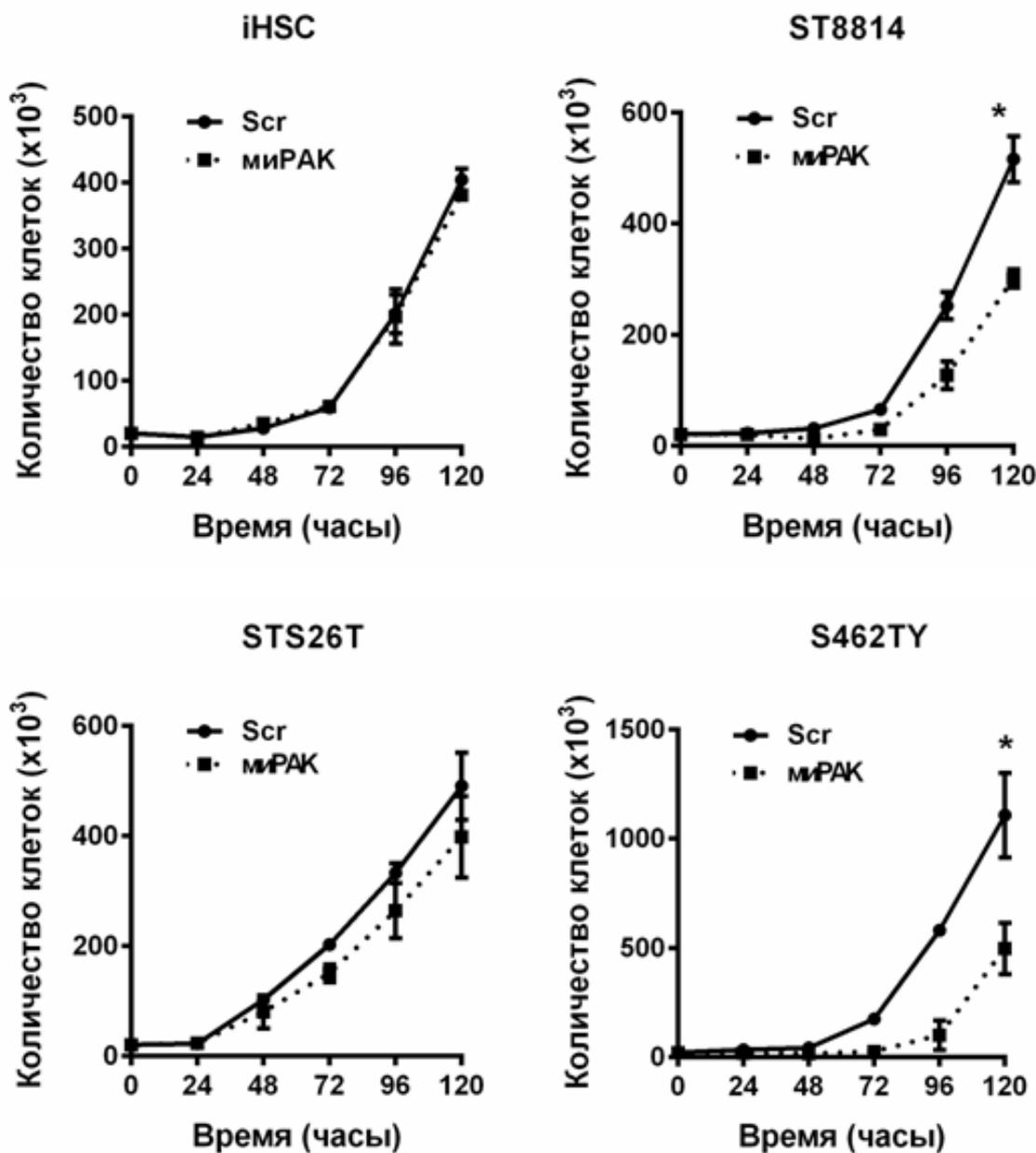


Рисунок 7. Влияние генетического нокада на рост клеток MPNST и iHSC.

Кривые роста клеток MPNST и iHSC, трансфицированных миРНК против *PAK1/2/3* (миPAK) или контрольной рандомизированной миРНК (Scr – scrambled).

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

2.3. Влияние выключения *PAK1/2/3* на клеточную инвазию MPNST

Для того чтобы определить, принимают ли белки *PAK1/2/3* участие в распространении злокачественных опухолей оболочек периферических нервов, в экспериментах *in vitro* оценивали изменение инвазивной способности клеток MPNST и iHSC под воздействием ингибиторов ПАК или миРНК против генов ПАК (Рис. 8).

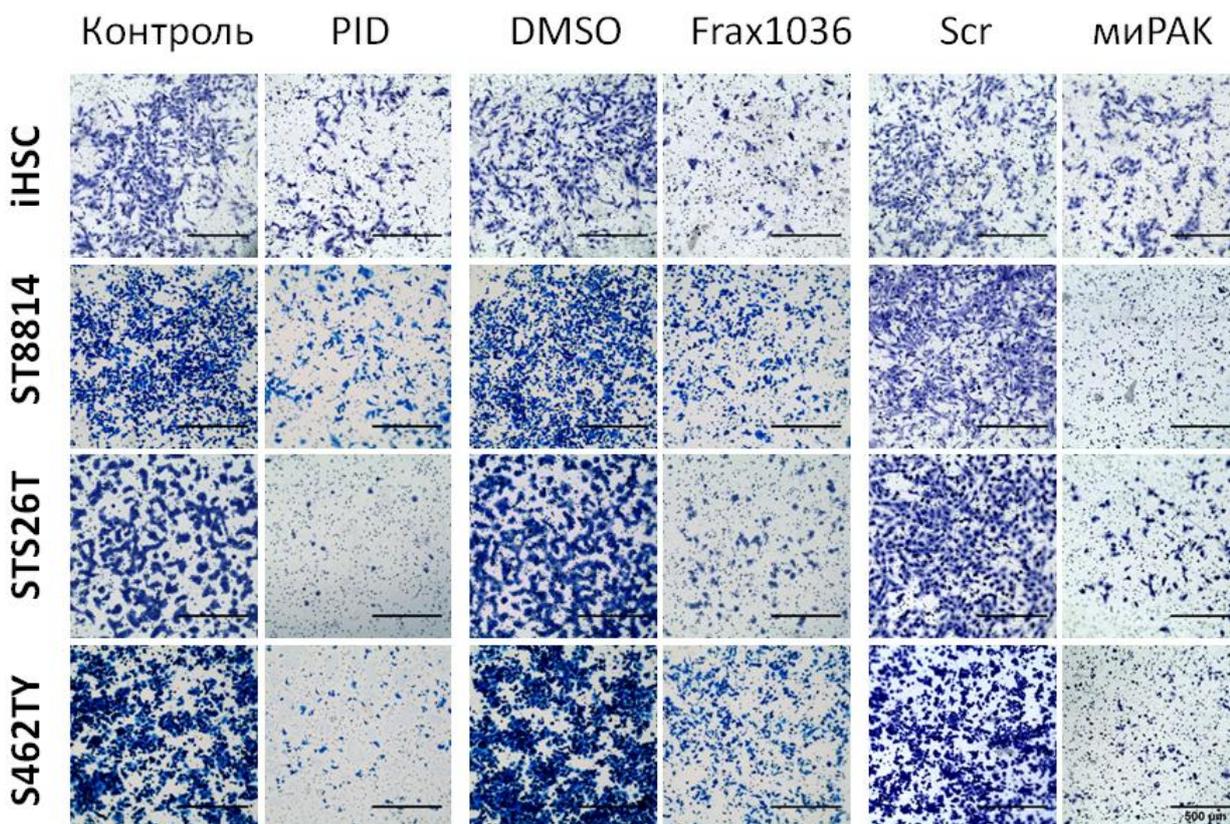


Рисунок 8. Репрезентативные фотографии клеток MPNST и iHSC, проникших через матриксель в модифицированных камерах Бойдена.

В качестве контролей для GST-PID (PID) использовали «пустой» вектор (Контроль), для Frax1036 – растворитель DMSO, для миРНК против *PAK* (миРАК) – рандомизированную миРНК (Scr).

Значительное снижение клеточной инвазии наблюдали в клетках, продуцирующих GST-PID, а также клетках, обработанных Frax1036, по сравнению с контролями (Рис. 8). Подобные результаты были получены в экспериментах с использованием РНК-интерференции - нокдаун *PAK1/2/3* эффективно подавлял инвазию iHSC, S462TY, STS26T и ST8814 (Рис. 8).

Эти данные показывают, что *PAK* I группы могут выполнять регуляторную функцию в инфильтрации клетками опухолей прилежащих тканей и метастазировании. Интересно, что нокдаун и ингибирование *PAK1/2/3* эффективно подавляли инвазию как клеток MPNST, так и иммортализованных шванновских клеток. Очевидно, механизм регуляции клеточной инвазии, опосредованный *PAK1/2/3*, не является уникальным для клеток MPNST.

3. Изучение роли *PAK1/2/3* во внутриклеточной сигнализации MPNST

Для того чтобы изучить механизмы, посредством которых *PAK1/2/3* регулирует клеточный рост и инвазию MPNST, в клетках MPNST и iHSC, экспонированных Frax1036, GST-PID или миРНК против *PAK1/2/3*, была проанализирована активность ключевых сигнальных каскадов (Рис. 9).

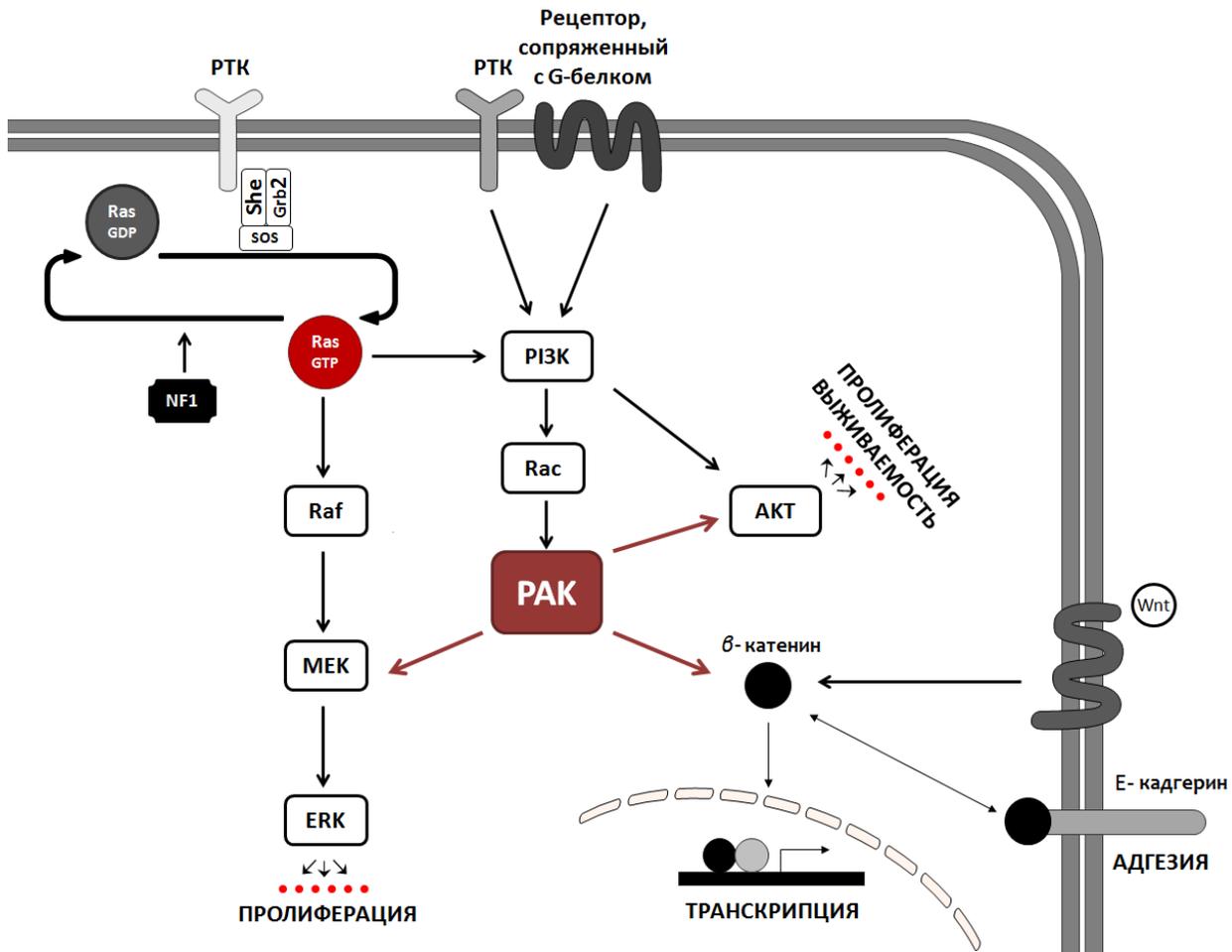


Рисунок 9. Роль PAK1/2/3 в регуляции путей сигнальной трансдукции, вовлечённых в патогенез MPNST.

Сигнальный путь RAF>MEK>ERK (каскад MAPK/ERK)

Из литературных данных известно, что в некоторых типах клеток PAK1/2/3 активируют MAPK/ERK путём фосфорилирования MEK1 по остатку серина [S298]. Как и предполагалось, экспрессия *GST-PID* и обработка Frax1036 в значительной степени подавляла автофосфорилирование PAK1/2/3 и фосфорилирование MEK1 по S298 (Рис. 10 и 11). Однако уровень фосфо-MEK1/2 [S217/S221] существенно не изменялся в клетках под воздействием ингибиторов PAK. Отсутствие эффекта Frax1036 и *GST-PID* на активацию MEK был подтверждён иммуноблоттингом на фосфо-ERK: из четырех испытуемых клеточных линий только в клетках ST8814, обработанных Frax1036, было выявлено изменение активности ERK (Рис. 11).

Подобные результаты были получены для клеток MPNST и iHSC, в которых PAK1/2/3 были выключены миРНК (Рис. 12). Таким образом, в отличие от многих других клеточных типов, в клетках MPNST фосфорилирование MEK1 по S298 не является обязательным для активации MEK, и регуляция ERK в этих клетках может осуществляться без участия PAK I группы.

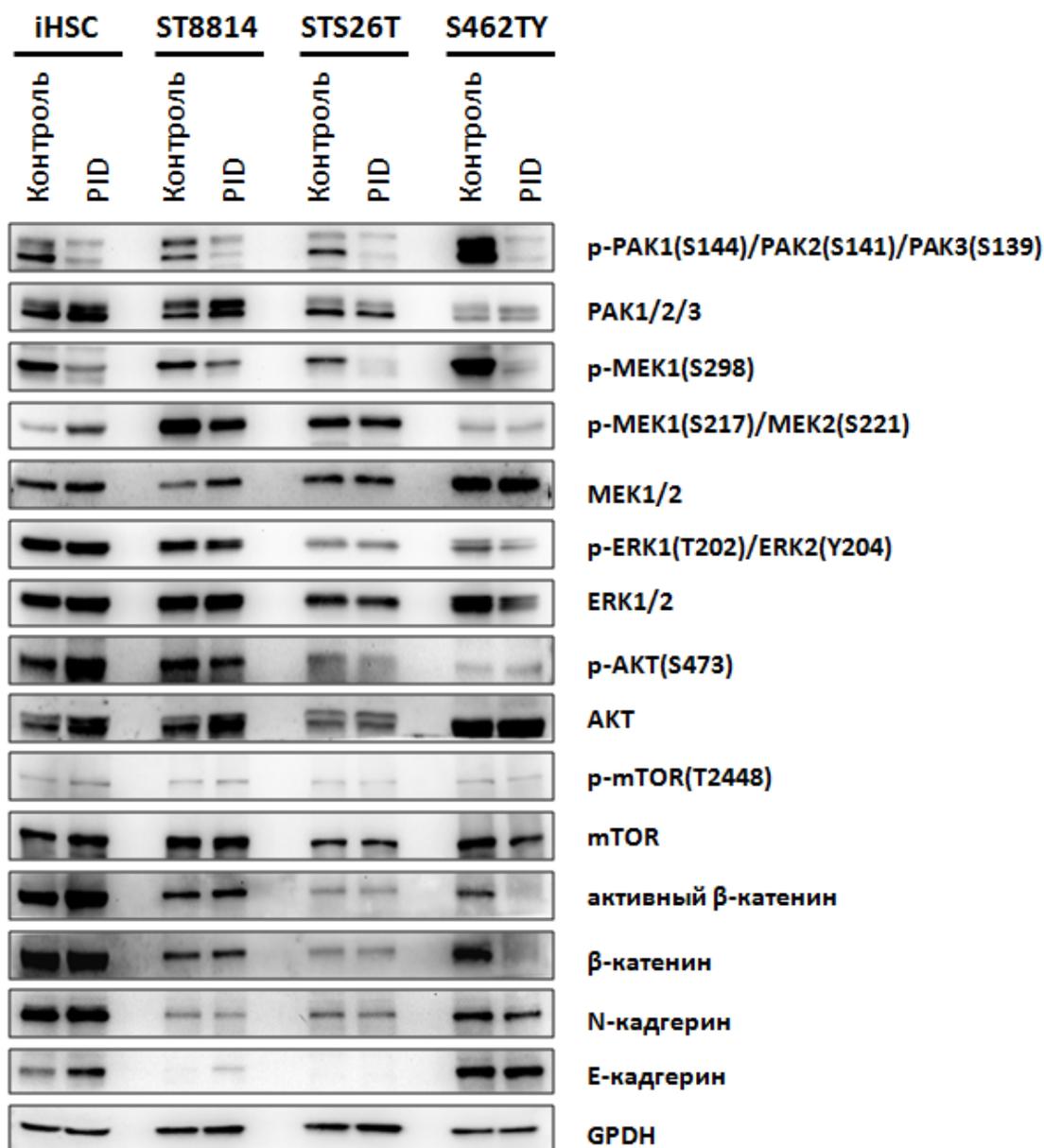


Рисунок 10. Влияние GST-PID на сигнализацию MAPK/ERK, AKT, β-катенина и продукцию кадгеринов.

Вестерн блот анализ активности каскадов MAPK/ERK, AKT>mTOR и β-катенина, а также уровней N- и E-кадгерина в клетках MPNST и iHSC, трансдуцированных рBMN-GST-PID (PID) или контрольным вектором рBMN-I-GFP (Контроль).

Киназный каскад PI3K (PI3K>PKB/AKT>mTOR)

Ранее было показано, что PAK I группы регулируют активацию киназ PKB/AKT, выполняя адаптерную функцию для 3-фосфоинозитол зависимой протеинкиназы 1 (phosphoinositide-dependent protein kinase 1, PDK1) или путём прямого фосфорилирования AKT. Мы обнаружили, что Frax1036, а также миРНК против *PAK1/2/3* подавляют фосфорилирование AKT в двух из трёх испытываемых линий MPNST (ST8814 и S462TY) (Рис. 11 и 12).

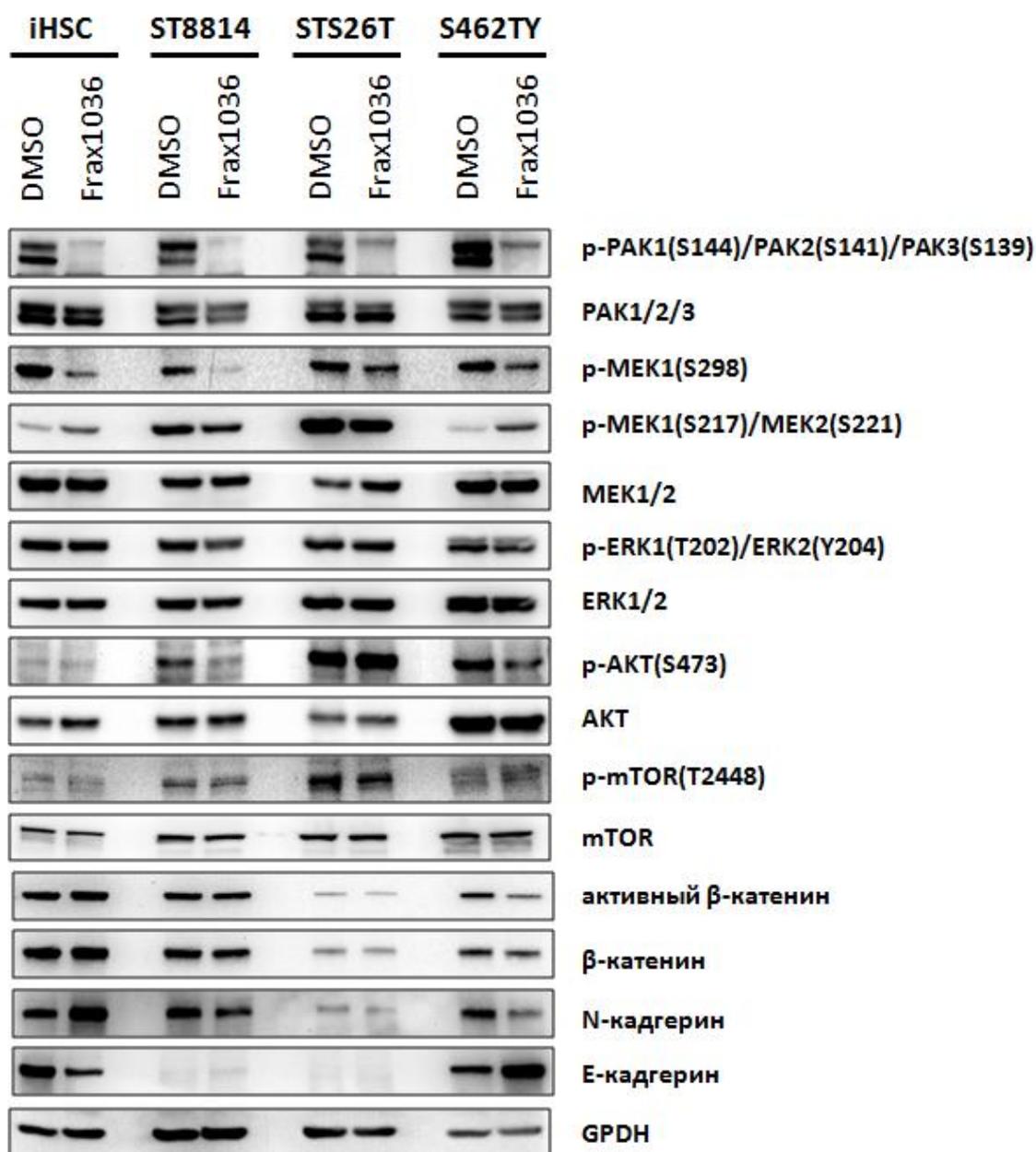


Рисунок 11. Влияние Frax1036 на сигнализацию MAPK/ERK, AKT, β-катенина и продукцию кадгеринов.

Вестерн блот анализ активности каскадов MAPK/ERK, AKT>mTOR и β-катенина, а также уровней N- и E-кадгерина в клетках MPNST и iHSC, обработанных Frax1036 или DMSO. Эффекты Frax1036 оценивали через 24 ч после добавления ингибитора в концентрациях, соответствующих IC₅₀ для четырёх клеточных линий, в полной ростовой среде.

Канонический сигнальный каскад Wnt (Wnt>β-катенин)

Из литературных данных известно, что канонический сигнальный каскад Wnt (Wnt>β-катенин), может быть активирован РАК. Мы изучили эффект ингибирования РАК на активность β-катенина в четырёх клеточных линиях. Клетки MPNST S462TY, чувствительные к ингибированию РАК1/2/3, показали

снижение активного (не фосфорилированного по S33/S37/T41) β -катенина. Эти данные позволяют предположить, что PAK1/2/3 может способствовать росту, инвазии и метастазированию клеток MPNST посредством стабилизации β -катенина.

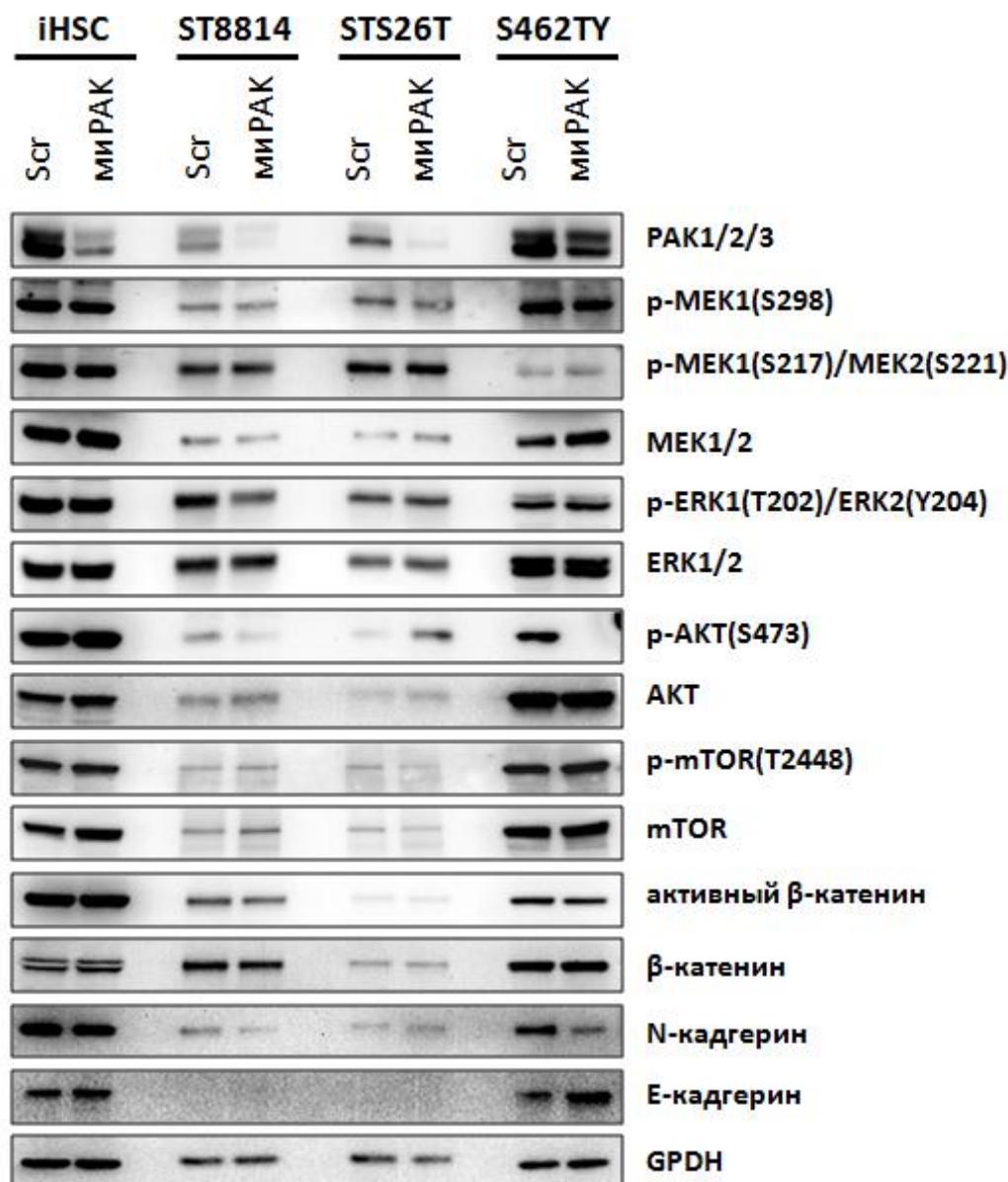


Рисунок 12. Влияние нокдауна PAK1/2/3 на сигнализацию MAPK/ERK, AKT, β -катенина и продукцию кадгеринов.

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

Эффекты миРНК оценивали через 72 ч после трансфекции в полной ростовой среде.

На основании того что β -катенин регулирует клеточную инвазию, в частности, за счёт контроля экспрессии генов молекул адгезии, мы исследовали

изменение уровней продукции N- и E-кадгерина в клетках под воздействием ингибиторов PAK1/2/3. Снижение уровня E-кадгерина и увеличение продукции N-кадгерина в опухолевых клетках, как правило, коррелирует с увеличением их инвазивного потенциала. В норме зрелые миелинизирующие шванновские клетки продуцируют E-кадгерин – важнейший компонент адгезионных контактов, в то время как N-кадгерин является маркером подвижных предшественников шванновских клеток. Иммуноблоттинг клеточных лизатов MPNST показал, что S462TY, STS26T и ST8814 продуцируют N-кадгерин, уровень которого снижается в отсутствие активного PAK1/2/3 (Рис. 10, 11 и 12). В клетках линии ST8814, продуцирующих GST-PID или обработанных Frax1036, происходила замена N-кадгерина на E-кадгерин, характерная для дифференцировки шванновских клеток. Таким образом, можно предположить, что PAK I группы регулируют инвазию и метастазирование MPNST, по крайней мере, отчасти, посредством контроля экспрессии молекул адгезии.

Как видно из рисунков 10, 11 и 12, ингибирование и нокдаун PAK в клеточных линиях MPNST модулирует активность сигнальных путей MAPK/ERK, PI3K и канонического каскада Wnt с различной эффективностью. Важно отметить, что клетки с более высоким уровнем фосфо-PAK1/2/3 (ST8814 и, особенно, S462TY) были более чувствительны к ингибиторам PAK1/2/3 и показали более значительное изменение активации AKT, β -катенина и экспрессии кадгерина в ответ на выключение PAK1/2/3. В клетках STS26T (спорадическая клеточная линия MPNST с низким уровнем фосфо-PAK1/2/3 и слабой чувствительностью к ингибиторам PAK), а также контрольных iHSC, активность данных каскадов существенно не изменялась. Наиболее неожиданным результатом оказалась высокая активность ERK во всех клеточных линиях в присутствии Frax1036, GST-PID и миРНК против PAK.

4. Индивидуальное и сочетанное воздействие ингибиторов PAK1/2/3 (Frax1036) и MEK1/2 (PD0325901) на рост и распространение MPNST

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

Принимая во внимание то, что инактивация PAK1/2/3 не является достаточной для подавления фосфорилирования ERK, мы предположили, что добавление ингибитора MEK может усилить антипролиферативный эффект Frax1036. Мы использовали аллостерический ингибитор MEK1/2 PD0325901 (PD-901) и обнаружили, что PD-901 предотвращает фосфорилирование ERK и угнетает пролиферацию клеток MPNST ST8814, STS26T и S462TY синергично с Frax1036 (Рис. 13). Аналогично, Frax1036 и PD-901 синергично подавляли жизнеспособность контрольных iHSC, однако, более высокие дозы ингибиторов потребовались для достижения биологического эффекта (Рис. 13).

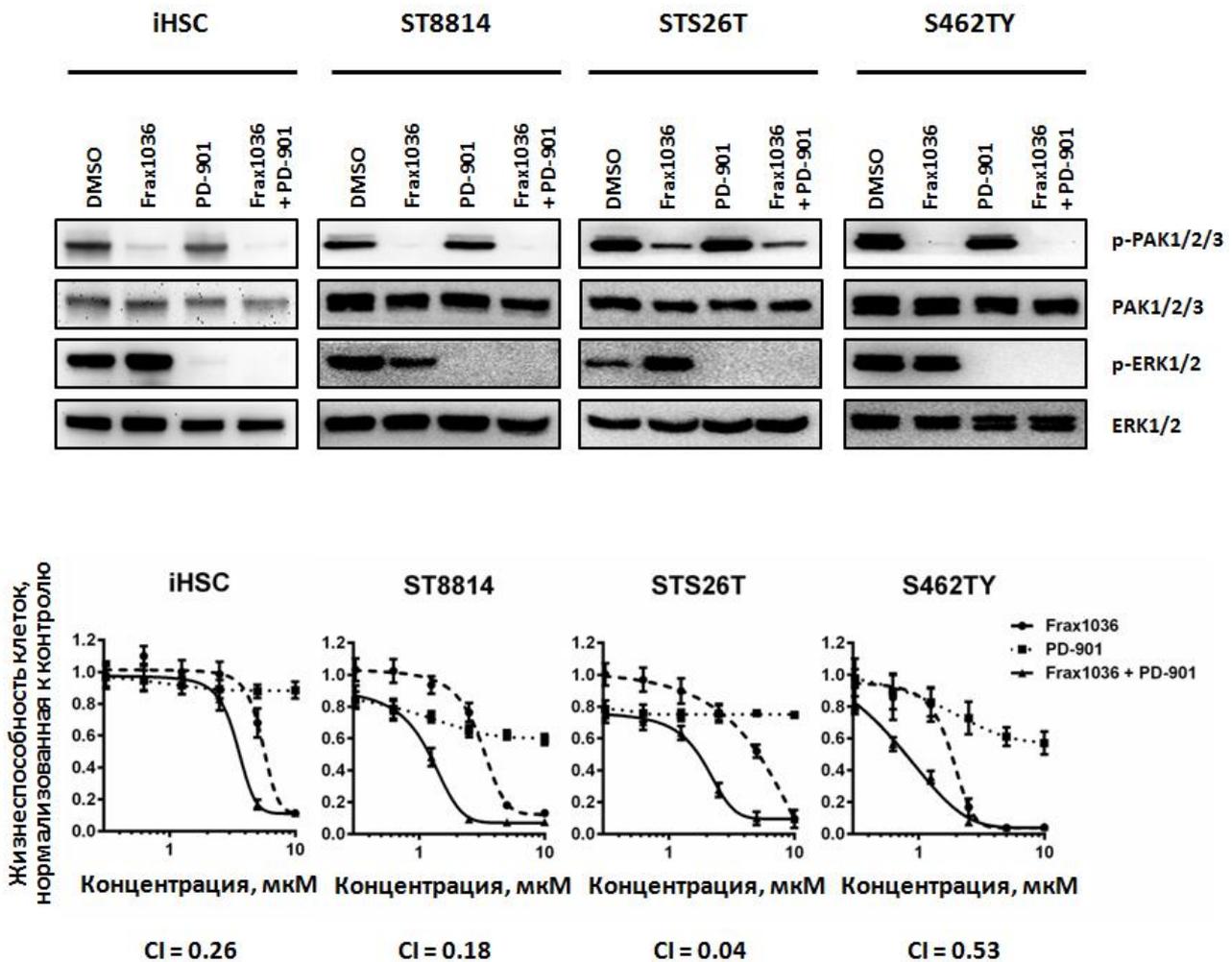


Рисунок 13. Синергический эффект ингибиторов PAK1/2/3 (Frax1036) и MEK1/2 (PD-901) на жизнеспособность клеток MPNST и iHSC.

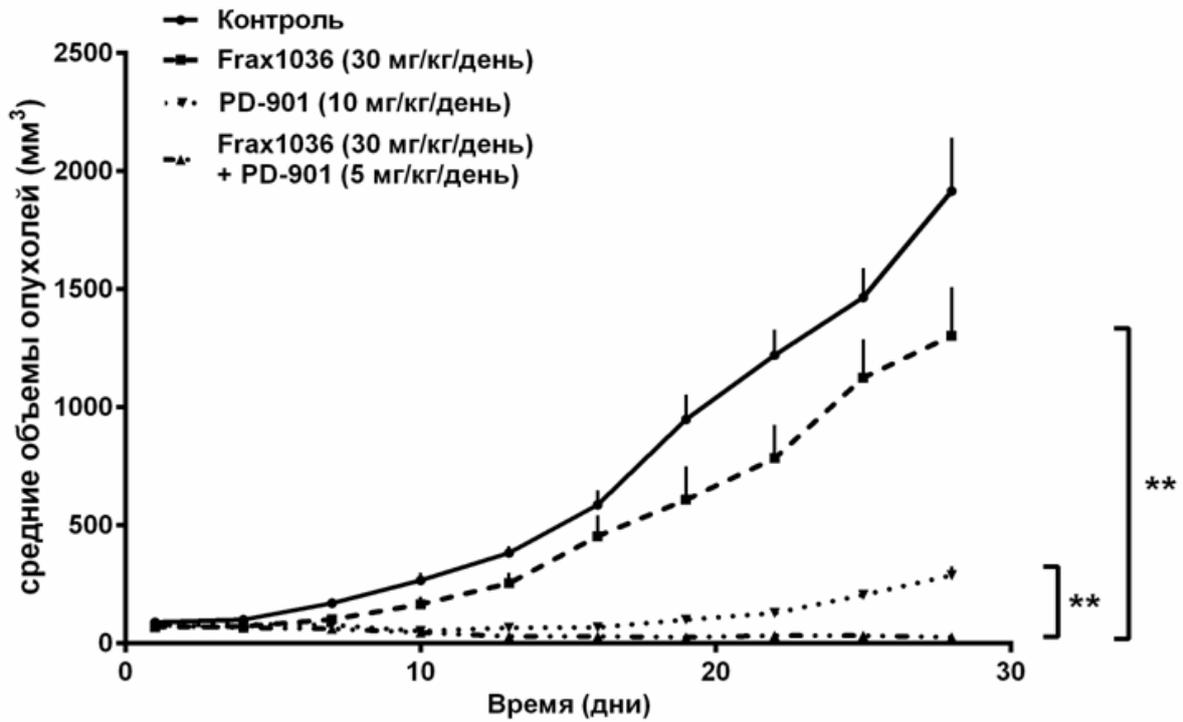
Вестерн блот анализ уровней фосфорилированных и общих белков PAK1/2/3 и ERK1/2 в клетках ST8814, STS26T, S462TY и iHSC, обработанных DMSO, Frax1036, PD-901 или комбинацией Frax1036 и PD-901. Кривые доза-эффект клеток, обработанных Frax1036 и PD-901. Комбинационные индексы (CI) сочетанного воздействия Frax1036 и PD-901. $CI < 1$ соответствует синергическому взаимодействию.

Данные кривых выживаемости представлены в виде среднего значения и стандартного отклонения.

4.2. Влияние Frax1036 и PD0325901 на рост подкожных ксенографтных MPNST

Для того чтобы определить, подтверждаются ли наблюдения, полученные на клеточных моделях, в экспериментах *in vivo*, была исследована противоопухолевая активность ингибитора PAK1/2/3 Frax1036 как индивидуального терапевтического агента и в комбинации с ингибитором MEK1/2 PD-901 в модели подкожных ксенографтов MPNST на линии бестимусных мышей *Nude* (Рис. 14).

STS26T



S462TY

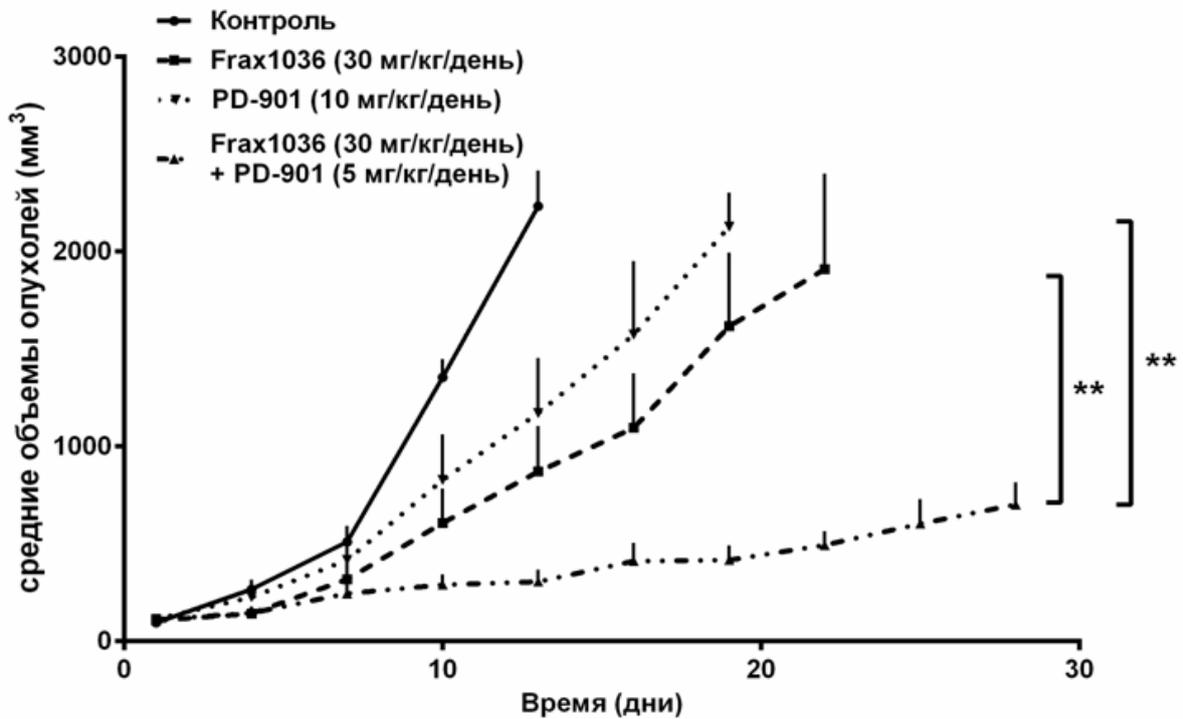


Рисунок 14. Изменение объёмов опухолей STS26T и S462TY у мышей в контрольных группах и группах, получавших Frax1036, PD-901 или комбинацию Frax1036 и PD-901. Данные представлены в виде среднего значения и ошибки среднего (**= $p < 0.01$).

Ксенографтные опухоли были индуцированы клетками MPNST S462TY и STS26T – из всех испытываемых клеточных линий только эти клетки являются туморогенными, т.е. способными образовывать опухоль в месте их введения лабораторным животным. Экспериментальную терапию начинали после появления опухолей. Мыши с опухолями были разделены на 4 группы, которые получали плацебо, Frax1036, PD-901 или комбинацию Frax1036 и PD-901 в течение 4 недель (Рис. 14).

Индивидуальная терапия Frax1036 незначительно замедляла рост ксенографтных опухолей STS26T, в то время как объёмы опухолей у мышей, получавших PD-901, были существенно меньше контрольных, а комбинация Frax1036 и PD-901 вызывала регрессию опухолей STS26T (Рис. 14). Терапия хорошо переносилась животными во всех экспериментальных группах и не выявила выраженной токсичности.

Через 28 дней после начала лечения мышей усыпляли и собирали ткани ксенографтных опухолей. Гистологический анализ выявил значительное снижение числа клеток, окрашенных антителами к маркёру пролиферации фосфо-гистону H3 (pHH3), в опухолях, экспонированных комбинации Frax1036 и PD-901. В этих опухолях, однако, не было выявлено апоптотического процесса, как показало окрашивание на расщеплённую каспазу 3 (CC3). Эти результаты указывают на то, что в конце длительного периода терапии Frax1036 и PD-901 преобладал цитостатический эффект (Рис. 15).

В аналогичном эксперименте с использованием ксенографтов S462TY только мыши, получавшие комбинацию Frax1036 и PD-901, дожили до последнего, 28 дня эксперимента. Из-за достижения опухолями веса более 10% массы тела, мышей в контрольной группе усыпили на 13 день эксперимента, мышей, получавших PD-901, - на 19 день, а мышей, получавших Frax1036, - на 22 день (Рис. 14).

Иммуногистохимическое исследование показало не только снижение уровня pHH3, но и увеличение интенсивности окрашивания на CC3 опухолевых тканей в группе, прошедшей сочетанную терапию (Рис. 15).

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

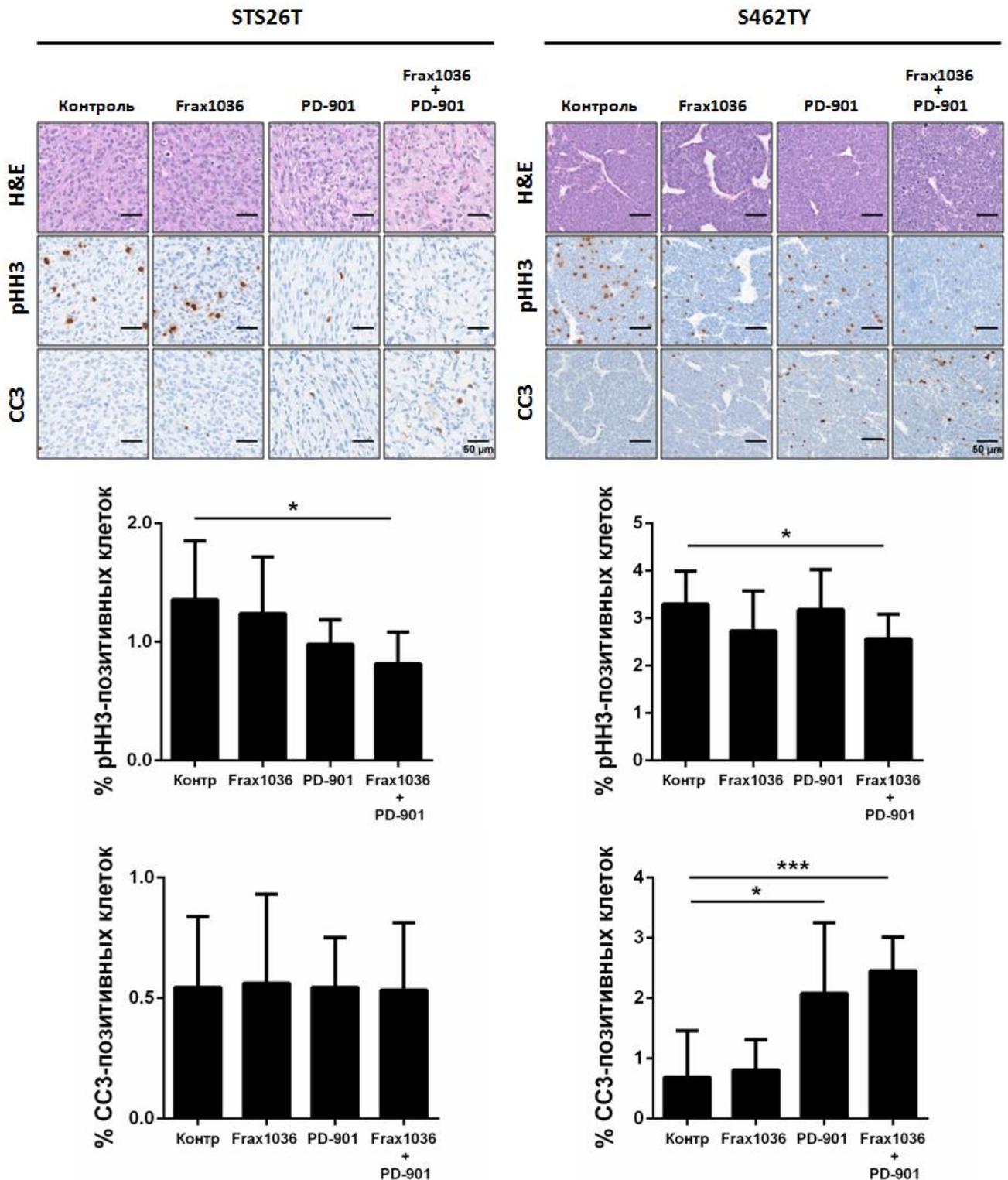


Рисунок 15. Иммуногистохимический анализ фосфо-гистона H3 (pHH3) и расщеплённой каспазы 3 (CC3) в контрольных и экспериментальных группах MPNST STS26T и S462TY.

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

4.3. Влияние Frax1036 и PD0325901 на формирование и рост экспериментальных лёгочных метастазов MPNST

Так как на сегодняшний день не создано модели спонтанных метастазов MPNST *in vivo*, мы использовали ранее описанную модель экспериментальных метастазов с модификациями. Согласно этой модели, внутривенная инъекция опухолевых клеток приводит к формированию микроколоний в лёгких. Из доступных нам клеточных линий MPNST была выбрана линия STS26T. В соответствии с опубликованными данными, инъекции только этих клеток в хвостовую вену приводят к формированию экспериментальных лёгочных метастазов. Для отслеживания колонизации лёгких клетками MPNST и роста экспериментальных метастазов в реальном времени клетки STS26T были помечены люциферазой светляка (Luc) (Рис. 16).

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

Животных распределяли в 4 группы, которые получали плацебо, Frax1036, PD-901 или комбинацию Frax1036 и PD-901 в течение 3 недель. Размеры метастазов оценивали методом биолюминесцентной визуализации (BLI).

Анализ данных BLI показал снижение скорости роста опухолей у мышей, получавших Frax1036 или PD-901, в сравнении с контрольной группой (Рис. 16А). У мышей, получавших комбинацию Frax1036 и PD-901, сигналы BLI оставались сравнимыми с фоновыми сигналами в течение всего эксперимента (Рис. 16А).

Вес лёгких, косвенно указывающий на количество и размер метастазов, значительно отличался в контрольной группе и группах, получавших Frax1036 или PD-901 (Рис. 16В). Вес лёгких у животных, получавших оба препарата, имел нормальные значения. Эти наблюдения были подтверждены данными иммуногистохимического исследования (Рис. 16Б). Массивные опухолевые метастазы были обнаружены в 6 из 7 контрольных животных. У животных, получавших Frax1036 или PD-901, были обнаружены опухоли лёгких меньшего размера, а у животных, прошедших сочетанную терапию не было выявлено опухолей.

Данные экспериментов *in vivo* позволяют предположить, что ингибирование RAK1/2/3 не является достаточным для подавления роста MPNST с низким исходным уровнем активности этих киназ, однако, эффективно предотвращает распространение MPNST. Таким образом, ингибиторы RAK1/2/3 являются перспективными терапевтическими агентами для MPNST высокой степени злокачественности и могут применяться в

сочетании с ингибитором MEK, обладающим выраженным антипролиферативным эффектом.

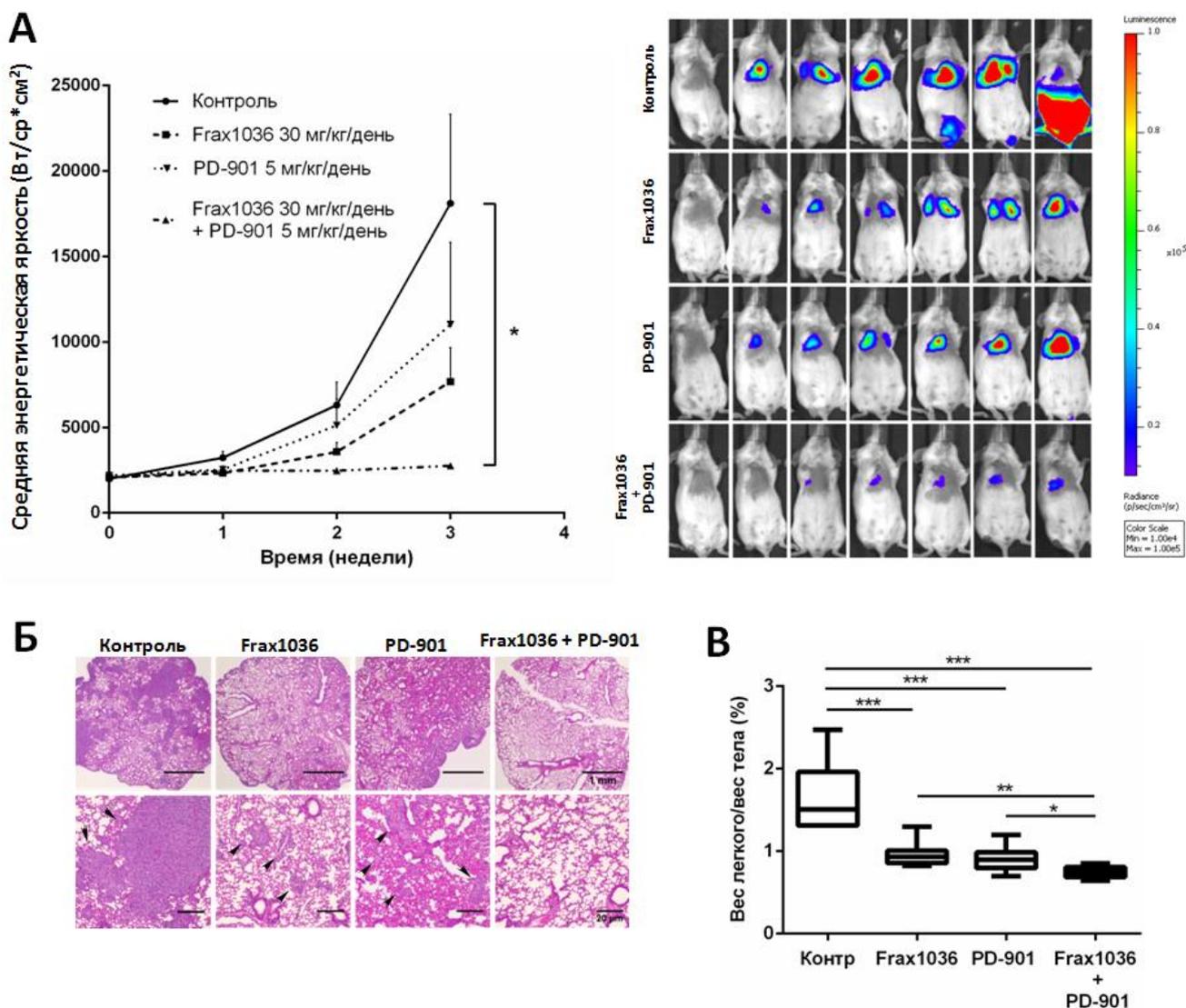


Рисунок 16. Комбинация Frax1036 и PD0325901 ингибирует рост лёгочных метастазов MPNST

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

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

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

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

Выводы:

1. Выявлено увеличение уровня фосфорилирования p21-активируемых киназ I группы (РАК1/2/3) в тканях злокачественных опухолей оболочек периферических нервов (MPNST) по сравнению с таковым в тканях доброкачественных опухолей (нейрофибром) и тканях нормальных периферических нервов человека. Установлено, что высокий уровень фосфо-РАК1/2/3 характерен для метастазов MPNST. Не обнаружено взаимосвязи между уровнем фосфорилирования РАК1/2/3 в опухолях и инактивацией гена *NF1* у пациентов.
2. Показано, что воздействие ингибиторов РАК1/2/3, а также генетический нокдаун *PAK1/2/3* снижают пролиферативную и инвазивную способность клеток MPNST. Обнаружена положительная корреляция между уровнем фосфо-РАК1/2/3 в клетках MPNST и их чувствительностью к инактивации РАК1/2/3.
3. Установлено, что ингибирование РАК1/2/3 и нокдаун кодирующих их генов в клетках MPNST с высоким уровнем фосфо-РАК1/2/3 вызывает снижение активности узловых компонентов сигнальных каскадов PI3K и Wnt, а также снижает уровень N-кадгерина. Подавление фосфорилирования киназы MEK1 по остатку серина 298, опосредованное ингибированием РАК1/2/3, не приводит к инактивации каскада MAPK/ERK *in vitro*.
4. Продемонстрировано, что введение модельным животным ингибитора p21-активируемых киназ I группы Frax1036 замедляет рост подкожных ксенографтных MPNST с высоким уровнем фосфо-РАК1/2/3. Воздействие Frax1036 не влияет на рост подкожных опухолей, индуцированных клетками MPNST с низким уровнем фосфо-РАК1/2/3, однако, вызывает уменьшение среднего совокупного размера лёгочных метастазов, индуцированных этими клетками.
5. Показано, что ингибиторы РАК1/2/3 (Frax1036) и MEK1/2 (PD0325901) взаимодействуют по синергическому типу и эффективно подавляют рост клеток MPNST при совместном использовании. Сочетанная терапия Frax1036 и PD0325901 в модели подкожных ксенографтных опухолей и в модели экспериментальных лёгочных метастазов MPNST оказывает более выраженный противоопухолевый эффект, чем индивидуальная терапия каждым из ингибиторов.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи в рецензируемых журналах:

- 1) **Semenova G**, Stepanova DS, Dubyk C, Handorf E, Deyev SM, Lazar AJ, Chernoff J. Targeting Group I p21-activated Kinases to Control Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumor Growth and Metastasis. *Oncogene*. 2017, 36(38):5421-5431.
- 2) **Semenova G**, Stepanova DS, Deyev SM, Chernoff J. Medium Throughput Biochemical Compound Screening Identifies Novel Agents for Pharmacotherapy of Neurofibromatosis Type I. *Biochimie*. 2017; 135:1-5.
- 3) **Semenova G**, Chernoff J. Targeting PAK1. *Biochem. Soc. Trans.* 2017, 45(1):79-88.
- 4) Radu M*, **Semenova G***, Kosoff R*, Chernoff J. Pak Signaling in the Development and Progression of Cancer. *Nat. Rev. Cancer*. 2014; 14(1):13-25.

* Вклад в работу данных авторов равнозначен.

Тезисы докладов на конференциях:

- 1) **Semenova G**, Stepanova DS, Karchugina S, Dubyk C, Deyev SM, Lazar AJ, Chernoff J. Unique roles of group I PAK isoforms in regulating MPNST cell viability. AACR-NCI-EORTC Molecular Targets and Cancer Therapeutics Conference (2017, Филадельфия, США)
- 2) **Семёнова Г.В.**, Чернофф Дж., Деев С.М. Доклинические испытания ингибитора p21-активируемых киназ на моделях злокачественных опухолей оболочек периферических нервов. XI Международная Пироговская научная медицинская конференция студентов и молодых учёных (2016, Москва).
- 3) **Semenova G.**, Chernoff J. Role of Group I Paks in MPNST cell proliferation, migration and invasion. 106th American Association for Cancer Research annual meeting (2015, Филадельфия, США)
- 4) **Semenova G.**, Chernoff J. Pak1 and Pak4 inhibition affects NF1-associated MPNST cell proliferation. 26th Neurofibromatosis (NF) Conference (2013, Монтерей, США)
- 5) **Semenova G.**, Chernoff J. The role of group A and B PAKs in malignant peripheral nerve sheath tumor development. 19th Fox Chase Cancer Center Postdoctoral and Student Conference (2013, Филадельфия, США).