

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

на правах рукописи

Ларионова Татьяна Дмитриевна

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

Специальность 1.5.3 – «Молекулярная биология»

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва – 2022

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

Научный руководитель: доктор химических наук Шахпаронов Михаил Иванович

Научный консультант: доктор биологических наук Павлюков Марат Самвелович

Официальные оппоненты:

Бойчук Сергей Васильевич, доктор медицинских наук, член-корреспондент Академии наук Республики Татарстан, профессор, заведующий кафедрой общей патологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования "Казанский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Егоров Егор Евгеньевич, доктор биологических наук, профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории клеточных основ развития злокачественных заболеваний Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук.

Ведущая организация:

Государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится 15 февраля 2023 г. в 11.00 на заседании диссертационного совета 24.1.037.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук по адресу: 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10.

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

Автореферат разослан « ___ » _____ 2022 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
д.ф.-м.н. Олейников В.А.



ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Глиобластома (GBM) — наиболее агрессивная форма рака головного мозга с крайне неблагоприятным прогнозом для пациентов. Стандартным методом лечения GBM является хирургическая резекция и последующие радиотерапия и химиотерапия ДНК-алкилирующим агентом темозоломидом. Однако это лечение трудно назвать эффективным: фактически в 100% случаев возникает рецидив заболевания, который приводит к гибели пациента. Таким образом, актуальность разработки новых методов терапии глиобластомы не вызывает сомнений.

Неудачи в лечении GBM вызваны несколькими факторами: это и невозможность полного хирургического удаления опухоли из-за ее близкого расположения к жизненно важным структурам головного мозга, и малое количество лекарственных веществ, способных проникать через гематоэнцефалический барьер, и, наконец, крайне высокая меж- и внутриопухолевая гетерогенность глиобластом. Межопухолевая гетерогенность приводит к тому, что новообразования сильно отличаются друг от друга, и это существенно усложняет поиск терапии, одновременно эффективной для разных пациентов. С другой стороны, высокая внутриопухолевая гетерогенность означает, что в пределах одной и той же опухоли присутствует множество популяций злокачественных клеток, различающихся на уровне генома, эпигенома, протеома и метаболома. Такие отличия приводят к различному спектру чувствительности к противоопухолевым препаратам. В результате, высокий уровень внутриопухолевой гетерогенности гарантирует, что фактически в любом новообразовании найдутся клетки, резистентные к используемой терапии и способные дать начало рецидиву опухоли. Однако молекулярные механизмы возникновения разнообразных популяций клеток глиобластомы в настоящий момент не изучены.

На основе многочисленных исследований были выявлены свойства клеток GBM, которые коррелируют с продолжительностью жизни пациентов. По результатам анализа транскриптома, протеома и метаболома GBM были разделены на несколько подгрупп, характеризующихся различной степенью агрессивности и общей выживаемостью больных. Однако многими авторами было показано, что транскриптом и протеом опухолевых клеток плохо коррелируют друг с другом. Это означает, что уровни мРНК и соответствующих им белков не совпадают, и изменение количеств транскрипта не обязательно влечет за собой равное изменение уровня белка.

Один из механизмов, позволяющих объяснить несовпадение транскриптома с протеомом, связан со строением и функционированием рибосом. Так, было показано, что рибосомы различаются входящими в них белками (*ribosomal proteins*, RPs), и присутствие тех или иных RPs может приводить к различному средству рибосом к определённым мРНК, влияя на эффективность их трансляции. В результате, вариации в RPs способствуют появлению избирательности рибосом в отношении транслируемых транскриптов и за счет этого сильно влияют на протеом клеток. Примечательно, что нарушения в уровне транскрипции генов RPs характерны для многих онкологических заболеваний, в том числе и для GBM, однако, каким образом изменение в содержании RPs влияет на функционирование рибосом в GBM, до сих пор не известно.

Помимо регуляции на уровне транскрипции, на функции RPs также влияет альтернативный сплайсинг их пре-мРНК. Однако эффект от изменений сплайсинга пре-мРНК RPs на работу рибосом до сих пор не исследован. Кроме того, к настоящему моменту не известно, как сплайсинг пре-мРНК RPs отличается в различных популяциях клеток GBM, населяющих одну и ту же опухоль. Также не ясно, какой эффект сплайс-изоформы RPs оказывают на фенотип опухолевых клеток.

Чтобы пролить свет на перечисленные выше важнейшие вопросы, в данной работе мы исследовали влияние альтернативного сплайсинга пре-мРНК рибосомных белков на протеом и фенотип клеток глиобластомы.

Цели и задачи исследования

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

Для достижения поставленной цели были поставлены следующие экспериментальные задачи:

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

Научная новизна и практическая ценность работы

В этой работе мы впервые обнаружили, что в клетках GBM, обитающих в различных зонах опухоли, альтернативный сплайсинг РНК приводит к формированию рибосом с разным белковым составом и, вероятно, с различной специфичностью к транслируемым ими мРНК. Более того, мы показали, что в данной экспериментальной модели состав рибосом регулируется именно на уровне альтернативного сплайсинга пре-мРНК, а не за счёт изменения транскрипции генов рибосомных белков.

Отличия в белковом составе рибосом между популяциями клеток GBM должны привести к значительным различиям в протеоме и, как следствие, в фенотипе этих клеток. В соответствии с этим утверждением, наша работа продемонстрировала новый механизм возникновения внутриопухолевой гетерогенности в GBM. Согласно полученным данным, снижение внеклеточного рН, которое происходит в центральной зоне глиобластомы по мере роста опухоли, приводит к увеличению экспрессии фактора сплайсинга SRSF4. Этот белок вызывает появление новой изоформы белка RPL22L1, которая способствует выживанию опухолевых клеток в неблагоприятных условиях некротического центра GBM. Мы полагаем, что, изменяя соотношение изоформ RPL22L1, клетки могут регулировать свой метаболизм, подстраиваясь под менее благоприятные условия, постепенно возникающие по мере отдаления опухолевых клеток от кровеносных сосудов. Кроме того, ранее неоднократно было показано, что низкий рН стимулирует увеличение стволовости клеток GBM. В настоящей работе мы впервые установили молекулярный механизм того, как именно снижение рН микроокружения может влиять на стволовые свойства опухолевых клеток.

Мы продемонстрировали, что важную роль в увеличении стволовости играет впервые описанная нами «b» изоформа белка RPL22L1, которая обладает функциями, полностью отличными от стандартной изоформы RPL22L1a. Из результатов проведенных экспериментов следует, что RPL22L1b не является компонентом рибосомы, а регулирует сплайсинг РНК, принимая участие в деградации длинной некодирующей РНК MALAT1.

Суммируя всё вышесказанное, можно утверждать, что полученные нами результаты демонстрируют большое влияние микроокружения на фенотип клеток GBM. Кроме того, мы обнаружили, что альтернативный сплайсинг пре-мРНК имеет гораздо более широкое

воздействие на протеом опухолевых клеток, чем предполагалось ранее. Все эти данные значительно расширяют наше понимание процесса развития глиобластомы и механизмов возникновения внутриопухолевой гетерогенности злокачественных новообразований.

Практическая ценность данной работы заключается в том, что нами было обнаружено вещество Fg1059, которое нарушает сплайсинг пре-мРНК RPL22L1 и приводит к гибели клеток GBM *in vitro* и ослаблению роста опухоли *in vivo*. Важно отметить, что для нормальных человеческих астроцитов данное соединение было менее токсично. Кроме того, согласно нашим данным, FG1059 существенно усиливал эффективность действия темозоломида – основного химиотерапевтического препарата, используемого для лечения пациентов с GBM. В результате, синергичное действие обоих соединений значительно снижало жизнеспособность клеток GBM. Таким образом, наши данные подтверждают, что соединения, воздействующие на сплайсинг и трансляцию являются многообещающими терапевтическими агентами. Применение этих веществ может вызывать гибель определённых популяций опухолевых клеток, снижая гетерогенность опухоли и таким образом увеличивая эффективность действия стандартной противораковой терапии. Наконец, так как Fg1059 показал хорошие результаты в мышинных моделях человеческой глиобластомы, мы можем предположить, что аналоги этого соединения в будущем могут быть использованы как отдельно, так и в комбинации с другими противоопухолевыми препаратами для лечения пациентов с GBM.

Публикации и апробация результатов работы

По теме диссертации опубликовано 6 статей в рецензируемых отечественных и зарубежных научных журналах. Результаты диссертационной работы были представлены на российских конференциях: XXXII Зимней молодёжной научной школе «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва, 2020) и VII съезде биохимиков России (Сочи-Дагомыс, 2021).

Личный вклад автора

Все исследования по теме диссертации, за исключением РНК-секвенирования (проводилось сотрудниками University of California Los Angeles, Los Angeles, CA, USA), анализа протеома (проводилось сотрудниками ФНКЦ Физико-химической медицины ФМБА, Москва, Россия), биоинформатического анализа (проводилось сотрудниками ФНКЦ Физико-химической медицины ФМБА, Москва, Россия), фракционирования полисом (проводилось сотрудниками МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия) и опытов *in vivo* (проводилось сотрудниками University of California Los Angeles, Los Angeles, CA, USA и The First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi, China), проведены лично соискателем. Личный вклад диссертанта состоит в непосредственном проведении исследований и обработке полученных данных, а также в участии в написании и подготовке к публикации тезисов докладов и статей с результатами исследования.

Структура и объем диссертации.

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, изложения результатов работы и их обсуждения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 128 страницах, содержит 56 рисунков и 3 таблицы. Список литературы включает 183 источника.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Изучение белкового состава рибосом у разных популяций клеток GBM

Согласно предыдущим исследованиям, клетки GBM, находящиеся в центральной («коровой») и периферической («краевой») областях опухоли, различаются по фенотипу, транскриптому и метаболиту. Для выяснения молекулярных механизмов, которые лежат в

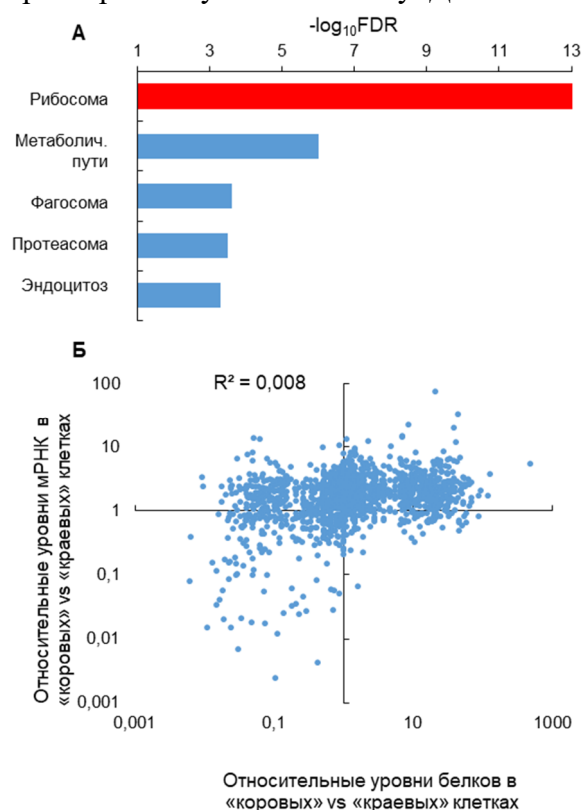


Рис. 1. *А* – Анализ обогащения белков, присутствующих в центре и на периферии опухоли в разных количествах. *Б* – График корреляции между протеомом и транскриптомом тканей GBM, полученных из краевых и центральных областей одной и той же опухоли. Ось *X* показывает различия в уровнях белков, ось *Y* показывает различия в уровнях соответствующих мРНК.

основе этих различий, мы сравнили протеом и транскриптом парных образцов тканей GBM («коровых» и «краевых»), а также первичных культур нейросфер, созданных из соответствующих зон опухоли. Соотнеся данные LC-MS/MS и проведенного нами секвенирования РНК, мы установили, что транскриптом и протеом отличаются в разных областях опухоли. Однако обнаруженные несовпадения крайне слабо коррелировали друг с другом: изменения транскриптома плохо соотносились с наблюдаемыми изменениями протеома (**рис. 1А**).

Так как на уровне протеома наибольшие различия были обнаружены для кластера рибосомных белков (**рис. 1Б**), мы предположили, что разница в белковом составе рибосом может быть причиной наблюдаемого несовпадения транскриптома с протеомом. Так, различия в составе рибосом могут приводить к изменению эффективности трансляции мРНК в клетках центра опухоли по сравнению с клетками периферии, что и является причиной наблюдаемых расхождений.

Чтобы проверить эту гипотезу, мы сравнили белковый состав рибосом, выделенных из разных популяций клеток GBM, в помощью метода SILAC (*Stable Isotope Labelling by Amino acids in Cell culture*) и последующей LC-MS/MS-масс-спектрометрии. Этот эксперимент выявил существенные количественные отличия в RPs между «краевыми» и «коровыми» клетками (**рис. 2А**). Далее мы провели РНК-секвенирование и сравнили различия в уровнях мРНК рибосомных белков с различиями протеома рибосом, однако не обнаружили какой-либо корреляции (**рис. 2Б**). Это указывает на низкое влияние уровня транскрипции на количество белка, включенного в состав рибосомы. Анализ сплайсинга пре-мРНК RPs позволил обнаружить, что самые значительные различия в сплайсинге наблюдались для белков, содержание которых наиболее сильно отличалось между рибосомами «коровых» и «краевых» клеток (**рис. 2В**). Основываясь на этих данных, мы предположили, что именно альтернативный сплайсинг (AS) пре-мРНК RPs может быть причиной различий в белковом составе рибосом у разных популяций клеток GBM.

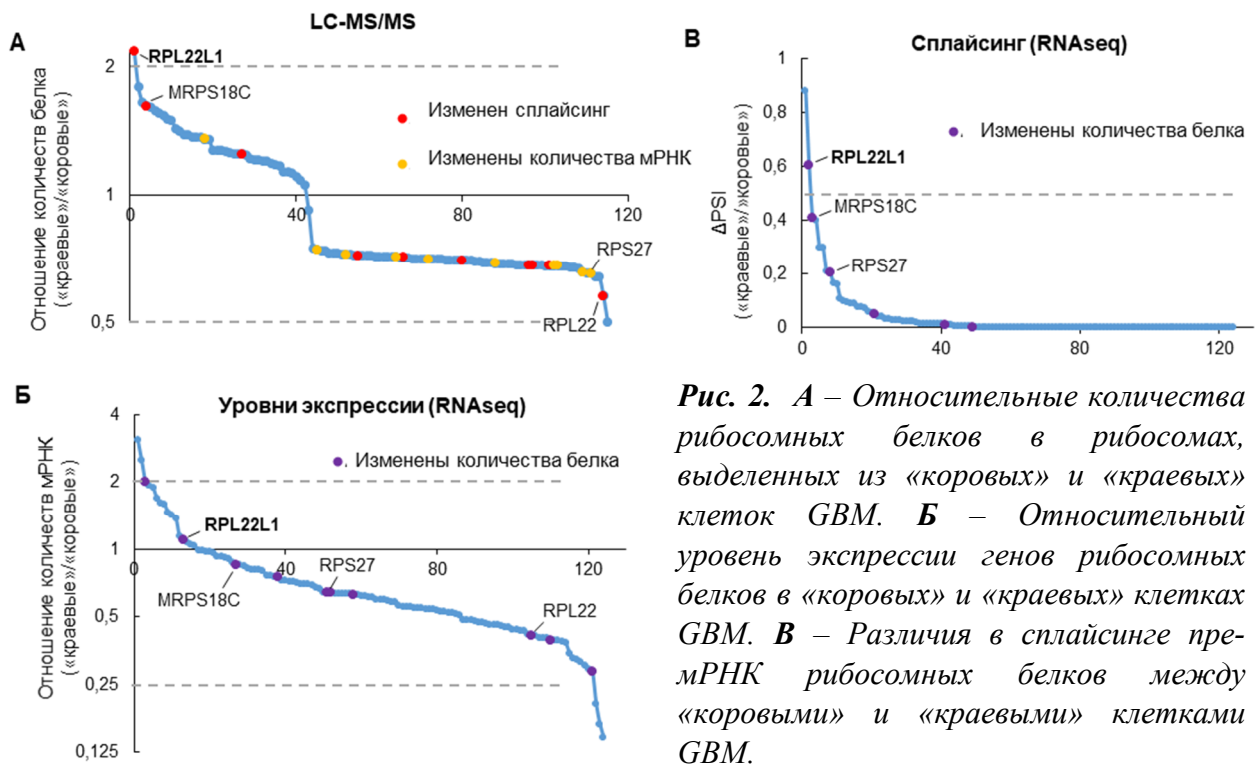


Рис. 2. А – Относительные количества рибосомных белков в рибосомах, выделенных из «коровых» и «краевых» клеток GBM. Б – Относительный уровень экспрессии генов рибосомных белков в «коровых» и «краевых» клетках GBM. В – Различия в сплайсинге пре-мРНК рибосомных белков между «коровыми» и «краевыми» клетками GBM.

1.2. Исследование альтернативного сплайсинга пре-мРНК RPL22L1.

Для дальнейших исследований мы выбрали белок большой субъединицы рибосомы RPL22L1, так как он наиболее сильно отличался между «коровыми» и «краевыми» клетками глиобластомы по уровню его включения в рибосому, а также по сплайсингу его пре-мРНК (рис. 2А и В). Данные РНК-секвенирования показали, что в результате AS пре-мРНК RPL22L1 образуются две изоформы, одна из которых не была описана ранее. Обнаруженные изоформы различаются 5'-концом третьего экзона, что приводит к сдвигу рамки считывания и образованию новой аминокислотной последовательности на С-конце белка. Мы назвали известную изоформу RPL22L1a, а впервые описанную в данной работе – RPL22L1b. Анализ ранее опубликованных результатов Riboseq глиобластомы (рис. 3А) показал, что обе изоформы RPL22L1 транслируются в белок.

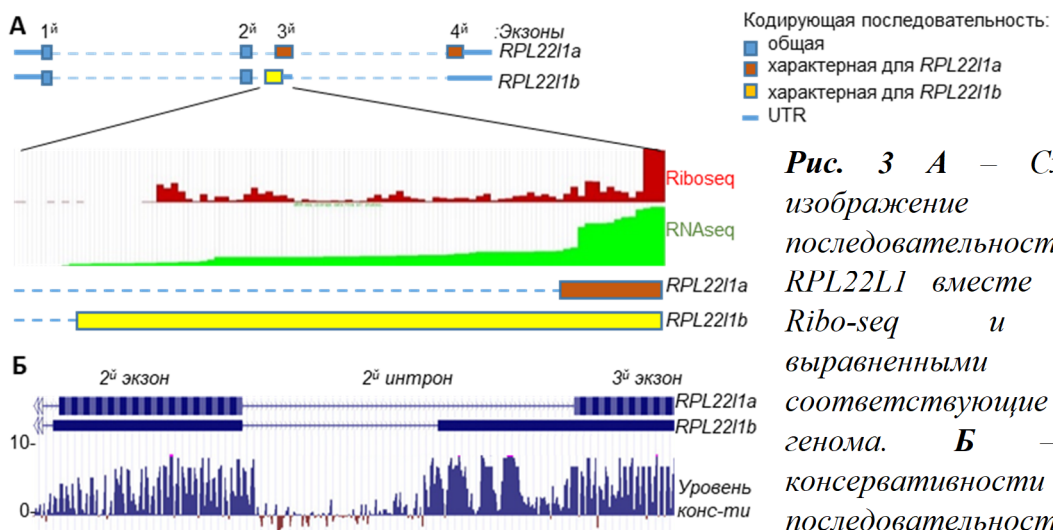


Рис. 3 А – Схематичное изображение последовательностей изоформ RPL22L1 вместе с данными Ribo-seq и RNA-seq, выравненными на соответствующие области генома. Б – Анализ консервативности последовательности ДНК области со 2-го по 3-й экзоны RPL22L1 у 100 позвоночных животных.

Проведенный PhyloP-анализ указывает на то, что 5'-конец третьего экзона, характерный только для изоформы RPL22L1b, высококонсервативен среди позвоночных, что резко контрастирует с последовательностью прилегающего интрона, которая не включается в мРНК RPL22L1b и имеет близкую к нулю степень консервативности (рис. 3Б). Эти данные позволяют предположить, что изоформа RPL22L1b могла появиться на ранних стадиях эволюции позвоночных.

Так как изоформа RPL22L1b ранее не была описана, мы подтвердили присутствие ее мРНК в разнообразных нормальных тканях человека (рис. 4А). Интересно, что самый высокий уровень мРНК этой изоформы был характерен для тканей головного мозга. Анализ сплайсинга пре-мРНК RPL22L1 в образцах тканей GBM показал, что соотношение RPL22L1b/RPL22La было по меньшей мере в 4 раза выше в центральных частях всех исследованных опухолей по сравнению с тканями периферии (рис. 4Б). Сходные результаты были получены при анализе сплайсинга пре-мРНК RPL22L1 в девяти первичных клеточных линиях GBM с подтвержденным «краевым» или «коровым» фенотипом (рис. 4В): для «краевых» клеток было характерно наличие изоформы RPL22L1a, для «коровых» - RPL22L1b.

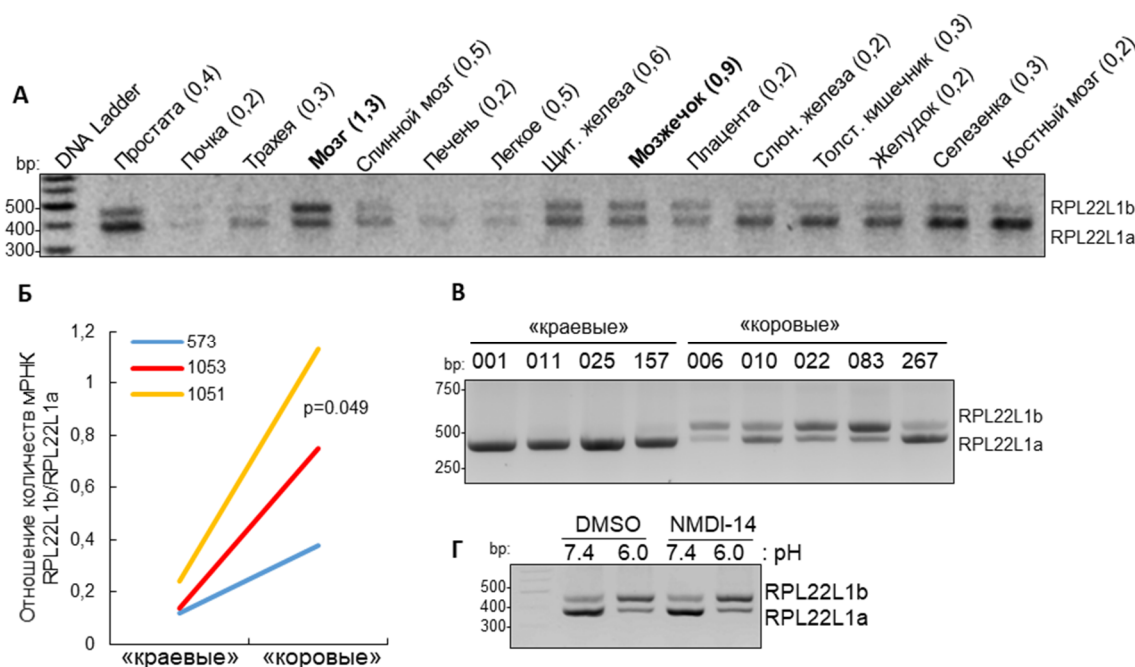


Рис. 4. А – Результаты ОТ-ПЦР образцов РНК, выделенных из различных тканей человека, с использованием праймеров к изоформам RPL22L1. Цифры указывают приблизительное соотношение интенсивности полос RPL22L1b/RPL22L1a. Б – Соотношение изоформ RPL22L1 в парных образцах тканей GBM, выделенных из краевых и центральных областей GBM. В – ОТ-ПЦР образцов РНК первичных культур GBM с «краевым» или «коровым» фенотипом с праймерами к изоформам RPL22L1. Г – Результаты ОТ-ПЦР образцов РНК из клеток GBM, культивируемых в течение 5 дней в нормальной (рН 7,4) или подкисленной (рН 6,0) среде с добавлением NMDI-14 или DMSO.

На следующем этапе мы подтвердили, что RPL22L1b присутствует в клетках на уровне белка. Так как использование альтернативного 3'-сайта сплайсинга в пре-мРНК RPL22L1b приводит к появлению преждевременного стоп-кодона, то теоретически может происходить нонсенс-опосредованный распад (NMD) образующейся мРНК. Однако

недавние исследования показали, что такие прогнозы не совсем точны и значительное число (от 5% до 30%) потенциальных мишеней NMD на самом деле не подвергаются деградации посредством этого механизма. Чтобы проверить, деградирует ли мРНК RPL22L1b в ходе NMD, мы обработали первичные культуры GBM низкомолекулярным ингибитором NMD – NMDI-14. Как видно из **рис. 4Г**, NMDI-14 не оказывал заметного влияния на количества мРНК RPL22L1b.

Далее мы постарались напрямую детектировать белок RPL22L1b в клетках глиобластомы. Сложность этой задачи заключается в отсутствии антител, специфичных к RPL22L1b. Тем не менее, мы провели иммуноблоттинг с антителами к N-концу RPL22L1, последовательность которого идентична у обеих изоформ, а также антителами к полноразмерному RPL22L1a. В соответствии с данными РНК-секвенирования и ОТ-ПЦР мы продемонстрировали, что клетки GBM с «краевым» фенотипом экспрессируют стандартную изоформу RPL22L1a, в то время как в «коровых» присутствует вариант белка с меньшей молекулярной массой. Так как этот более легкий белок можно обнаружить только антителами к N-концу RPL22L1, то, скорее всего, он представляет собой изоформу RPL22L1b (**рис. 5А**). Кроме того, мы провели иммунофлуоресцентное окрашивание четырех линий раковых клеток, а также первичных культур GBM, полученных от разных пациентов, с использованием антител к N-концевой последовательности изоформ RPL22L1. Интересно, что в клетках, которые, согласно данным РНК-секвенирования и ОТ-ПЦР, преимущественно экспрессируют RPL22L1a, окрашивание происходило в основном в цитоплазме (**рис. 5Б**, верхний ряд), в то время как в клетках с преимущественной экспрессией RPL22L1b, окрашивание происходило в ядре (**рис. 5Б**, нижний ряд). Таким образом, данные, приведённые выше, свидетельствуют о присутствии эндогенного белка RPL22L1b в различных типах клеток, в том числе и в GBM.

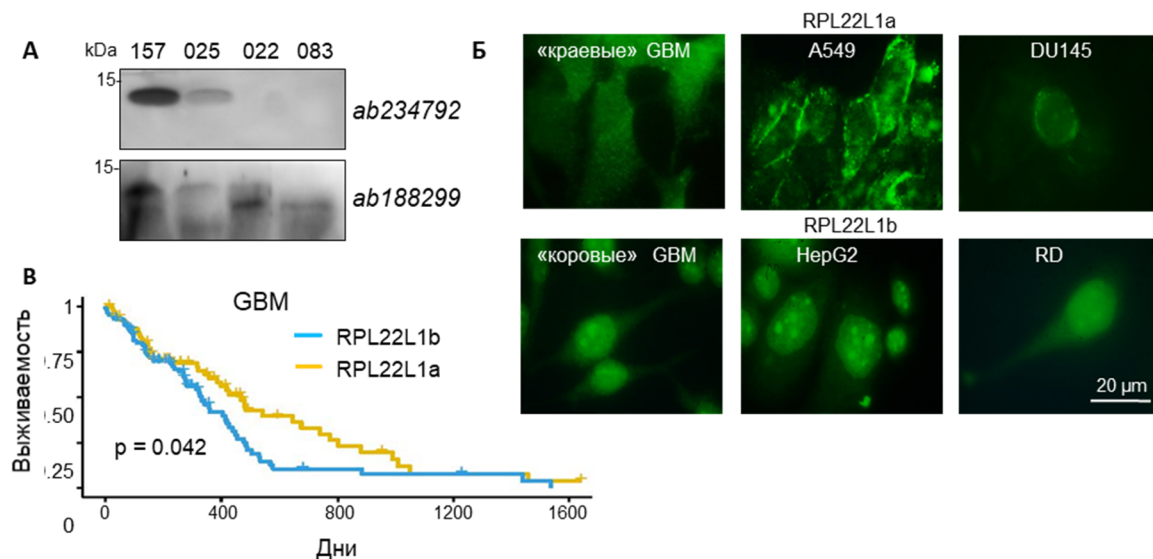


Рис. 5. *А* – Иммуноблоттинг лизатов первичных культур GBM с «краевым» (157, 025) и «коровым» (022, 083) фенотипами. Верхняя панель – детекция антителами к полноразмерному белку RPL22L1, нижняя панель – детекция антителами к N-концу RPL22L1, последовательность которого идентична у обеих изоформ. *Б* – Флуоресцентные микрофотографии клеток с эндогенной экспрессией RPL22L1a (верхняя панель) или RPL22L1b (нижняя панель), окрашенных с помощью антител к N-концевой части RPL22L1. *В* – Кривые Каплана-Мейера, показывающие общую выживаемость пациентов с GBM, разделенных на группы на основе типа сплайсинга пре-мРНК RPL22L1.

Наконец, мы провели биоинформатический анализ базы данных TCGA и показали, что экспрессия RPL22L1b у пациентов с GBM коррелирует с более короткой выживаемостью (рис. 5B).

На основании полученных данных мы сделали вывод о том, что обнаруженная в нашей работе новая изоформа RPL22L1b экспрессируется как в нормальных тканях, так и в опухолях, и что внутриклеточная локализация этой изоформы отличается от известной изоформы RPL22L1a.

2. Изучение функций изоформ RPL22L1 в клетках GBM

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

Чтобы понять, в каких случаях в клетках глиобластомы происходит образование RPL22L1b, мы культивировали нейросферы *in vitro* в различных условиях: в кислой среде; при гипоксии; в виде монослоя на слое ламинина; в отсутствие витаминов; без глюкозы; без факторов роста; в присутствии темозоломида. Как видно из рис. 6A, только воздействие кислого pH приводило к появлению RPL22L1b, причем количества мРНК RPL22L1b зависело как от времени культивирования, так и от значений pH среды. (рис. 6Б, В).

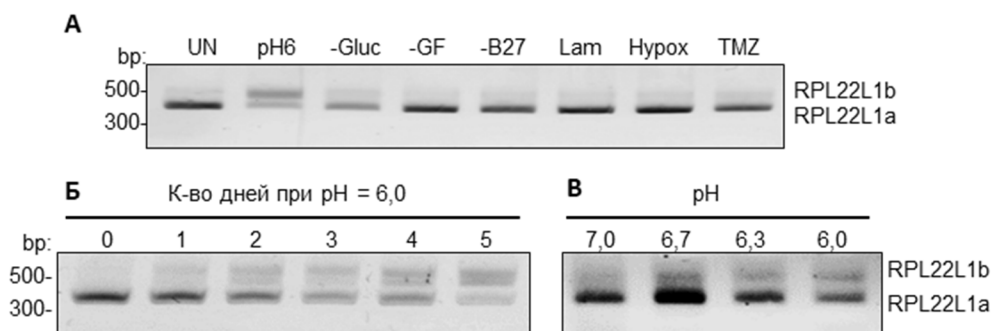
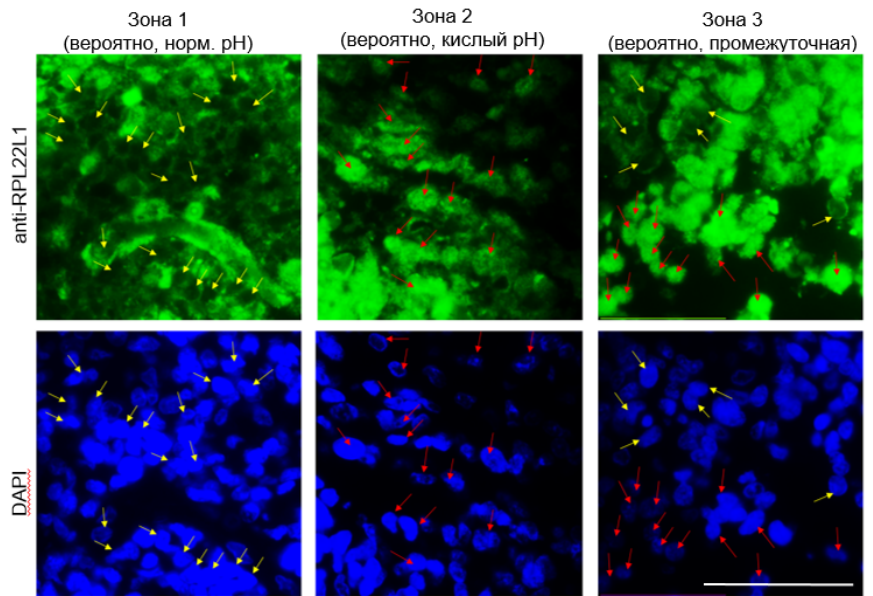


Рис. 6. *A* – Оценка количества мРНК изоформ RPL22L1 в клетках GBM, которые культивировались при различных условиях: UN – контрольные клетки в нормальной среде; pH6 – pH культуральной среды доводили до 6,0; -Gluc – среда без глюкозы; -GF – среда без факторов роста; -B27 – среда без питательной добавки;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

Чтобы изучить, влияет ли внеклеточный pH на соотношение изоформ RPL22L1 *in vivo*, мы исследовали внутриклеточную локализацию RPL22L1a и RPL22L1b в тканях GBM, полученных от пациентов. В первом эксперименте мы окрасили большой участок ткани GBM, который содержал несколько морфологически различных зон, антителами к N-концевой части RPL22L1 и красителем DAPI. Наши результаты показали, что в некоторых областях опухоли RPL22L1 был локализован в цитоплазме – вероятно, это области с нормальным внеклеточным pH, в то время как в других областях RPL22L1 имел преимущественно ядерную локализацию – в таких областях опухоли pH, вероятно, был понижен (рис. 7).

Рис. 7.

Иммунофлуоресцентное окрашивание различных участков тканей GBM антителами к RPL22L1 (зеленый) и DAPI (синий). Желтые и красные стрелки указывают на клетки с цитоплазматической и ядерной локализацией RPL22L1 соответственно.



Чтобы подтвердить наши предположения, мы использовали рН-взвешенную молекулярную МРТ для получения парных образцов тканей GBM из областей опухоли с закисленным и нормальным внеклеточным рН (рис. 8А). Последующее иммунофлуоресцентное окрашивание парных образцов от четырех разных пациентов антителами к RPL22L1 и красителем DAPI показало, что области с низким рН содержат повышенное количество изоформы RPL22L1, расположенной в ядре (рис. 8Б). Такой результат указывает на то, что закисленное микроокружение действительно смещает сплайсинг в сторону образования RPL22L1b в глиомах человека *in situ*.

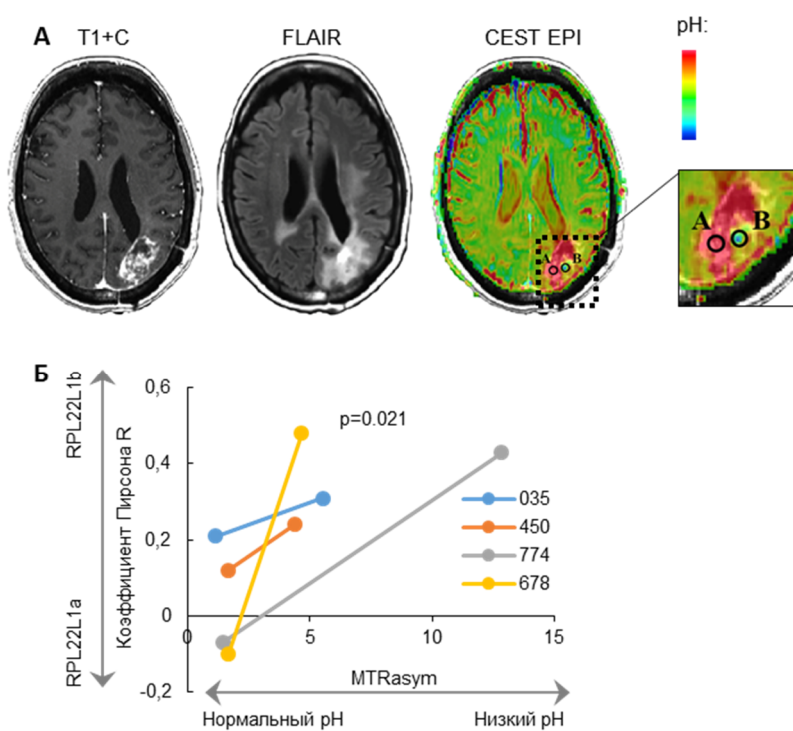


Рис. 8. А – Результаты МРТ опухоли GBM с контрастным усилением. Слева направо: постконтрастные T1-взвешенные изображения (показывают границы опухоли), T2-взвешенные изображения FLAIR (визуализация границ воспаления), и рН-взвешенные МР-изображения CEST EPI (показывают изменения рН). Области, которые использовались для получения биопсий с низким и нормальным рН, обозначены как «А» и «В» соответственно. Б – Соотношение коэффициента колокализации окрашивания

RPL22L1 и DAPI и значений MTR_{asym} для соответствующих образцов опухоли. MTR_{asym} отображает кислотность области опухоли: большие значения MTR_{asym} соответствуют меньшему значению внеклеточного рН; коэффициент колокализации отражает соотношение изоформ RPL22L1b/RPL22L1a.

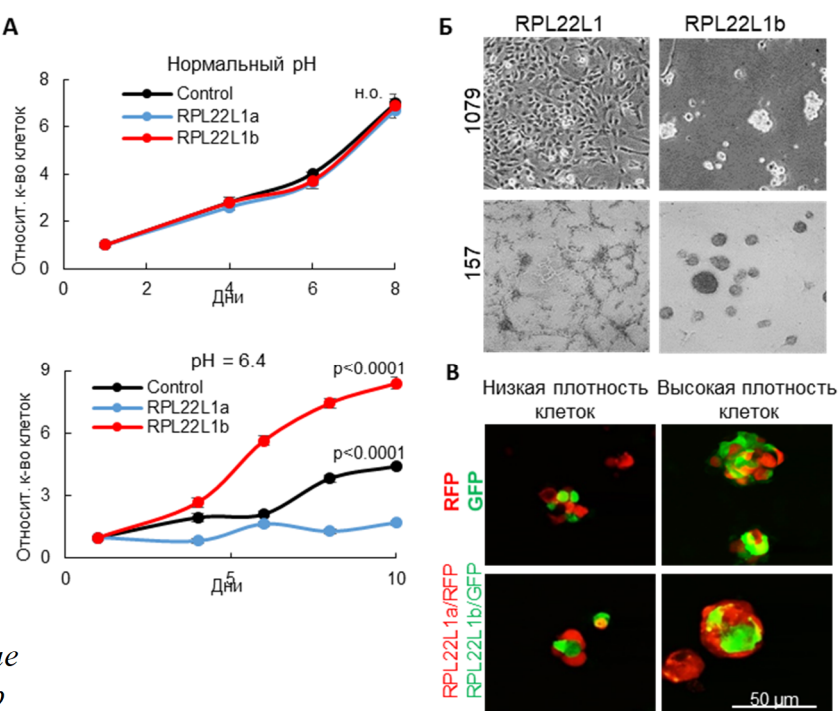
2.2. Определение функций изоформ RPL22L1

Далее мы проверили, может ли сверхэкспрессия RPL22L1a или RPL22L1b влиять на пролиферацию клеток GBM в нормальной или кислой среде (рис. 9А). В обычной среде все тестируемые клетки демонстрировали одинаковую скорость роста. Однако при $pH \approx 6,4$ только клетки со сверхэкспрессией RPL22L1b сохраняли скорость пролиферации неизменной. Контрольные клетки, трансдуцированные пустым вектором, в условиях низкого pH росли в 2 раза медленнее, а клетки с оверэкспрессией RPL22L1a не могли пролиферировать вовсе.

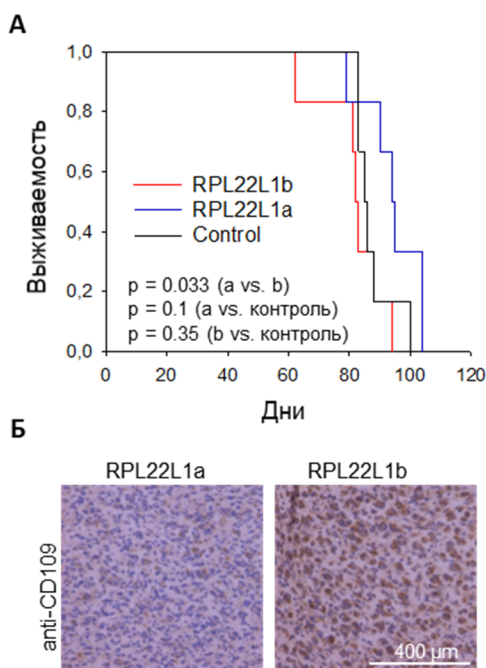
Интересно, что изоформы RPL22L1 сильно влияли на внешний вид GBM: клетки, сверхэкспрессирующие RPL22L1a, росли в виде прикрепленного к пластику монослоя, что довольно необычно для первичных культур GBM, а клетки со сверхэкспрессией RPL22L1b формировали плотные нейросферы неправильной формы, напоминающие культуры, обогащенные стволовыми клетками (рис. 9Б).

Поскольку, согласно нашим данным, изоформа RPL22L1a характерна для «краевых» клеток GBM, а RPL22L1b, напротив, для «коровых», мы исследовали локализацию клеток со сверхэкспрессией RPL22L1a и RPL22L1b при совместной культивации. Для этого мы одновременно трансдуцировали клетки GBM лентивирусами, кодирующими флуоресцентные белки (GFP или RFP), и лентивирусами, кодирующими изоформы RPL22L1. После получения клеточных линий, стабильно экспрессирующих RPL22L1a/RFP и RPL22L1b/GFP, культуры смешивали друг с другом для дальнейшей культивации и образования нейросфер. В результате нам удалось показать, что клетки, сверхэкспрессирующие RPL22L1a/RFP, располагались на периферии нейросфер, тогда как клетки с RPL22L1b/GFP находились в центре (рис. 9В). Такой результат свидетельствует о том, что экспрессия изоформ RPL22L1 может оказывать существенное влияние на пространственное расположение клеток глиобластомы внутри опухоли.

Рис. 9. А – График скорости роста первичной культуры GBM, клетки которой были трансдуцированы лентивирусами, кодирующими RPL22L1a, RPL22L1b или пустой вектор (контроль), и культивировались в нормальной (pH 7,4) или подкисленной среде (pH 6,4). Б – Микрофотографии морфологических изменений клеток GBM при оверэкспрессии изоформ RPL22L1. В – Флуоресцентные микрофотографии нейросфер GBM полученные при совместном культивировании клеток - оверэкспрессирующих RPL22L1a/RFP или RPL22L1b/GFP.



Наконец, мы изучили влияние изоформ RPL22L1 на рост опухоли *in vivo*. Для этого в мозг иммунодефицитных мышей были инъецированы клетки GBM, сверхэкспрессирующие исследуемые изоформы. Как видно из графиков на **рис. 10А**, мыши, которым были введены клетки с экспрессией RPL22L1b, погибли раньше. Последующее



иммуногистохимическое окрашивание ксенотрансплантатов выявило значительное увеличение маркера «коровых» клеток CD109 в опухолях, сформированных клетками с сверхэкспрессией RPL22L1b (**рис. 10Б**).

Рис. 10. *А* – Кривые Каплана-Майера, показывающие выживаемость иммунодефицитных мышей, в мозг которых были введены клетки GBM человека с сверхэкспрессией RPL22L1a (красным), RPL22L1b (синим) или пустым вектором (контроль, черным). *Б* – Результаты иммуногистохимического окрашивания антителами к CD109 срезов опухолей, полученных от мышей с ксенотрансплантатами.

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

2.3. Изучение интерактома изоформ RPL22L1 в клетках GBM

Чтобы выяснить конкретные функции изоформ RPL22L1, мы идентифицировали белки, которые взаимодействуют с RPL22L1a и RPL22L1b, используя два взаимодополняющих подхода. В первом случае His₆-меченые рекомбинантные белки RPL22L1a и RPL22L1b иммобилизовали на магнитных частицах с Ni-NTA. Далее эти частицы инкубировали с лизатами клеток GBM, и связавшиеся белки идентифицировали с помощью LC-MS/MS. Анализ результатов этого эксперимента показал, что RPL22L1a взаимодействует с белками, участвующими в регуляции трансляции, в то время как RPL22L1b связывается с комплексом U1 snRNP, который участвует в процессе сплайсинга пре-мРНК (**рис. 11А**). Во втором варианте эксперимента мы сверхэкспрессировали в клетках GBM изоформы RPL22L1, меченые Fc-тагом. Далее с помощью Protein-A/G-магнитных частиц выделяли Fc-RPL22L1a и Fc-RPL22L1b, а также связавшиеся с ними белки. Для определения выделенных белков был использован метод LC-MS/MS-масс-спектрометрии. При такой постановке эксперимента нам удалось идентифицировать меньшее количество белков, однако полученные данные хорошо согласовались с результатами предыдущего опыта (**рис. 11Б**): RPL22L1a взаимодействовал с компонентами рибосомы, а RPL22L1b принимал участие в регуляции стабильности РНК.

Так как белок RPL22L1, благодаря наличию РНК-связывающего домена, способен напрямую взаимодействовать с РНК, мы выделили молекулы РНК, связывающиеся с Fc-RPL22L1a и Fc-RPL22L1b, используя метод РНК-преципитации на магнитных частицах. Капиллярный электрофорез, проведенный после элюции выделенной РНК, подтвердил

взаимодействие RPL22L1a с рибосомальной РНК (**рис. 11В**). Напротив, RPL22L1b не взаимодействовал с рРНК, однако связывался со множеством других РНК. Мы установили, что в дополнение к рРНК RPL22L1a взаимодействовал с мРНК белков, участвующих в дифференцировке стволовых клеток и сигнальном пути АКТ (**рис. 11Г**). Напротив, RPL22L1b взаимодействовал с мРНК белков, которые регулировали сплайсинг и апоптоз, а также с большим количеством различных длинных некодирующих РНК.

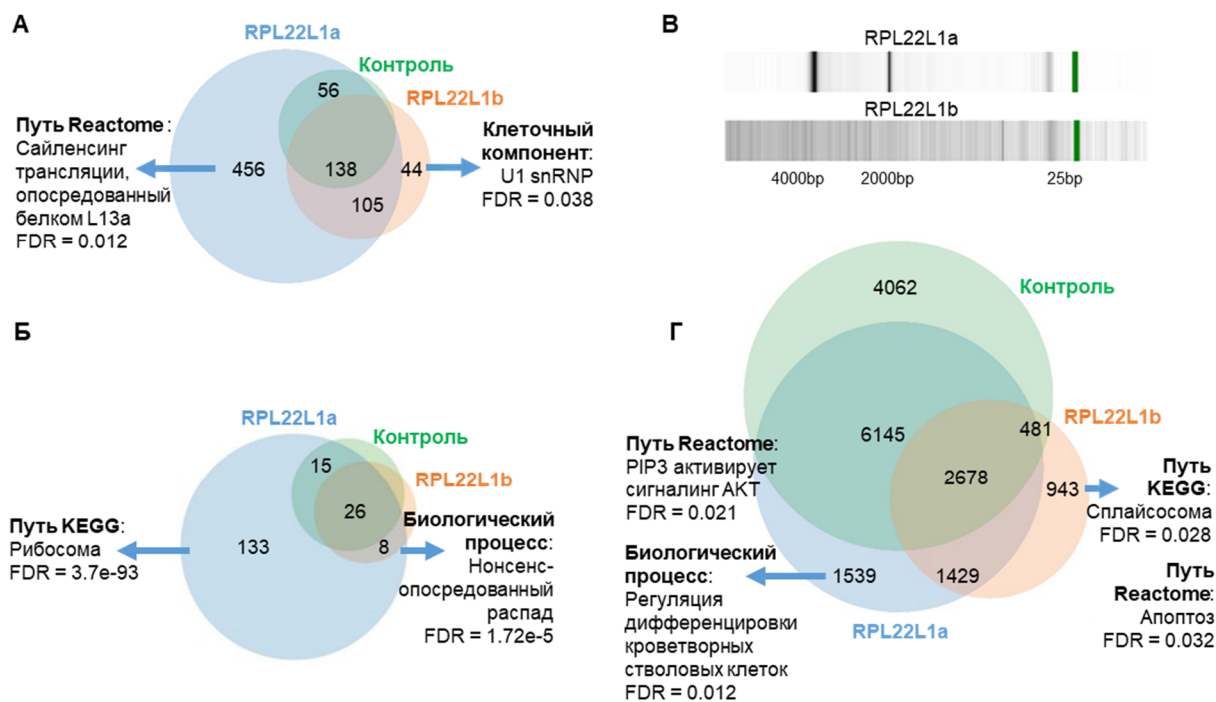


Рис. 11. *А* – Сравнительный анализ белков, связавшихся с рекомбинантными His6-мечеными RPL22L1a (синим), RPL22L1b (красным) или контролем – пустыми магнитными частицами (зеленым). *Б* – Сравнительный анализ белков, связавшихся с Fc-мечеными RPL22L1a (синим), RPL22L1b (красным) или контрольным белком (зеленым). *В* – Капиллярный электрофорез РНК, взаимодействующих с Fc-RPL22L1a и Fc-RPL22L1b. *Г* – Диаграмма Венна, иллюстрирующая количества молекул РНК, связавшихся с Fc-RPL22L1a (синим), Fc-RPL22L1b (красным) или контрольным белком (зеленым).

Таким образом, мы можем утверждать, что, хотя изоформы RPL22L1 имеют идентичную N-концевую аминокислотную последовательность, их интерактомы различны. RPL22L1a взаимодействует с рибосомой и непосредственно участвует в регуляции трансляции, тогда как RPL22L1b выполняет внерибосомные функции и участвует в процессинге РНК.

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

Основываясь на полученных данных об интерактоме RPL22L1b и его внутриклеточной локализации, мы предположили, что данный белок может участвовать в регуляции сплайсинга пре-мРНК. Анализ транскриптома клеток, сверхэкспрессирующих изоформы RPL22L1, показал, что RPL22L1b действительно индуцирует значительные изменения в сплайсинге РНК, способствуя включению экзонов и ослабляя удержание

интронов, что свидетельствует о повышении эффективности работы сплайсосомного комплекса в целом (рис. 12А, Б). Анализ обогащения показал, что RPL22L1b регулирует сплайсинг пре-мРНК белков репарации ДНК, а также белков, участвующих в пролиферации стволовых клеток. Эти результаты совпадают с нашими данными о влиянии RPL22L1b на транскриптом клеток GBM.

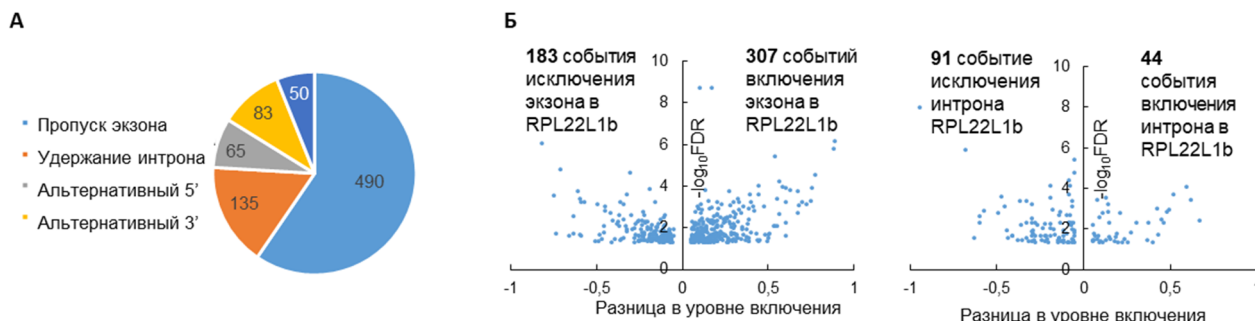
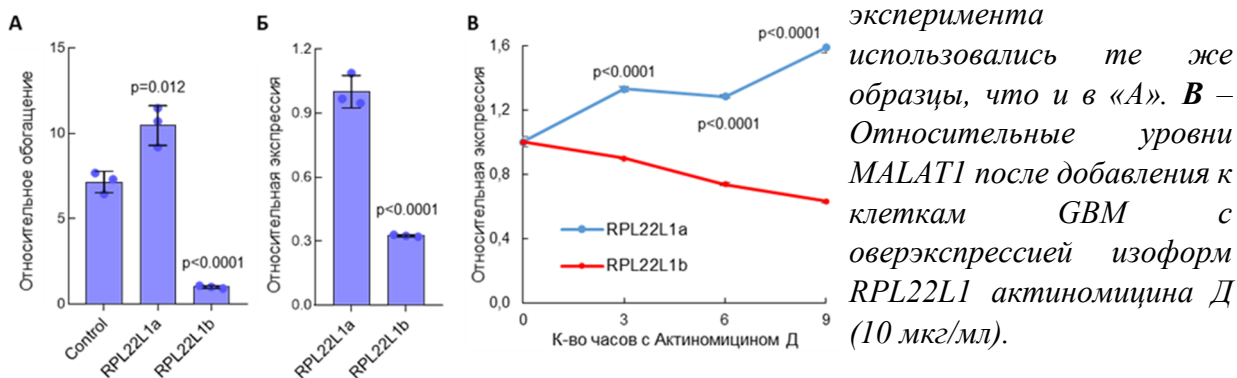


Рис. 12. А – Круговая диаграмма, иллюстрирующая количество и тип событий альтернативного сплайсинга в 157 клетках GBM, стабильно экспрессирующих RPL22L1b, по сравнению с контрольными клетками. Б – График, демонстрирующий статистически значимые события альтернативного сплайсинга, связанные с пропуском экзона (левая панель) и удержанием интрона (правая панель), обнаруженные в образцах из «А».

Однако, поскольку RPL22L1b не входит в состав сплайсосомы, мы предположили, что этот белок регулирует сплайсинг через некоего посредника. Основываясь на результатах анализа интерактома RPL22L1b, в качестве такого посредника мы предположили длинную некодирующую РНК MALAT1, которая участвует в регуляции сплайсинга РНК и может непосредственно связываться со сплайсосомным комплексом U1 snRNP. Это объясняет, почему компоненты U1 snRNP ко-преципитировали с RPL22L1b (рис. 11А). Чтобы определить, как взаимодействие RPL22L1b-MALAT1 влияет на клетки GBM, мы выделили молекулы РНК, ко-преципитировавшие с RPL22L1b, и подтвердили связывание этой изоформы с MALAT1 с помощью qRT-PCR (рис. 13А). Далее мы показали, что оверэкспрессия RPL22L1b значительно снижает уровень MALAT1 в клетках (рис. 13Б). Это позволяет предположить, что RPL22L1b индуцирует деградацию MALAT1. Для подтверждения этой гипотезы мы обработали клетки GBM, сверхэкспрессирующие изоформы RPL22L1, ингибитором транскрипции – актиномицином Д. Последующий анализ методом qRT-PCR показал, что RPL22L1b существенно снизил

Рис. 13. А – Результаты qRT-PCR с праймерами к MALAT1. Б – Анализ экспрессии MALAT1 в 157 GBM, стабильно экспрессирующей различные изоформы RPL22L1. Для эксперимента

использовались те же образцы, что и в «А». В – Относительные уровни MALAT1 после добавления к клеткам GBM с оверэкспрессией изоформ RPL22L1 актиномицина Д (10 мкг/мл).



стабильность MALAT1 (**рис. 13В**). Основываясь на этих результатах, мы можем заключить, что RPL22L1b влияет на сплайсинг пре-мРНК, вызывая деградацию MALAT1. Это хорошо согласуется с ранее опубликованными данными, согласно которым снижение количества MALAT1 приводит к высвобождению факторов сплайсинга из ядерных спеклов, что сопровождается активацией сплайсинга в клетках и увеличению событий включения экзона. Таким образом, мы можем заключить, что деградация MALAT1 и оверэкспрессия RPL22L1b оказывают схожее воздействие на сплайсинг пре-мРНК в клетках.

Ранее было показано, что в клетках рака молочной железы MALAT1 снижает экспрессию белка CD133. Поскольку CD133 является ключевым маркером стволовых клеток GBM, мы исследовали взаимосвязь между присутствием изоформ RPL22L1 и стволовыми свойствами клеток GBM. Для этого мы использовали проточную цитометрию и окрашивание клеток антителами к CD133, (**рис. 14А**), а также qRT-PCR с праймерами к ряду маркеров стволовости (**рис. 14Б**). Согласно полученным результатам, RPL22L1b действительно усиливал экспрессию CD133, а также других маркеров раковых стволовых клеток: ALDH1A3, Nanog и Oct4. Интересно, что обе изоформы RPL22L1 снижали экспрессию GFAP, характерного для более дифференцированных клеток GBM, однако эффект RPL22L1b был более выраженным. Наконец, проведя эксперимент по анализу частоты формирования нейросфер, мы продемонстрировали, что в культурах GBM с оверэкспрессией RPL22L1b заметно увеличено количество стволовых опухолевых клеток (**рис. 14В**).

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

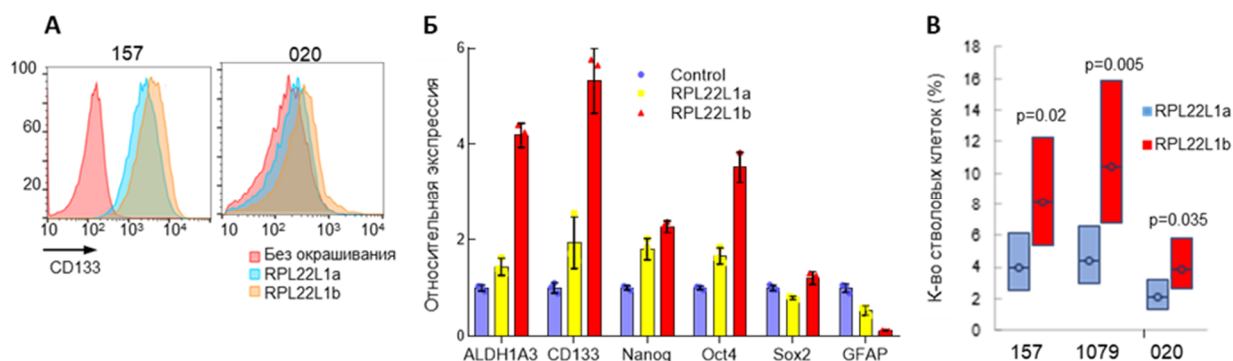


Рис. 14. А – Цитофлуориметрический анализ экспрессии CD133 в клетках GBM, оверэкспрессирующих изоформ RPL22L1. Б – Относительное содержание мРНК ALDH1A4, CD133, Nanog, Oct4, Sox2 и GFAP в клетках с оверэкспрессией изоформ RPL22L1 и контрольных клетках. В – Оценка относительного количества стволовых клеток с помощью анализа формирования нейросфер в трех первичных культурах GBM с оверэкспрессией изоформ RPL22L1.

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

Поскольку RPL22L1a является компонентом рибосомы (**рис. 11Б**), мы исследовали его роль в регуляции белкового синтеза в клетках GBM. Мы показали, что оверэкспрессия RPL22L1a значительно увеличивает общий уровень трансляции (**рис. 15А**) и подтвердили эти данные для эндогенного RPL22L1a, продемонстрировав, что для первичных культур GBM, которые экспрессируют преимущественно RPL22L1a, характерен повышенный уровень синтеза белков в отличие от клеток, эндогенно экспрессирующих RPL22L1b (**рис. 15Б**). Чтобы дополнительно проверить эти результаты, мы провели фракционирование

рибосом, которое показало, что сверхэкспрессия RPL22L1a увеличивает содержание полисом, что указывает на активацию процесса трансляции (рис. 15B).

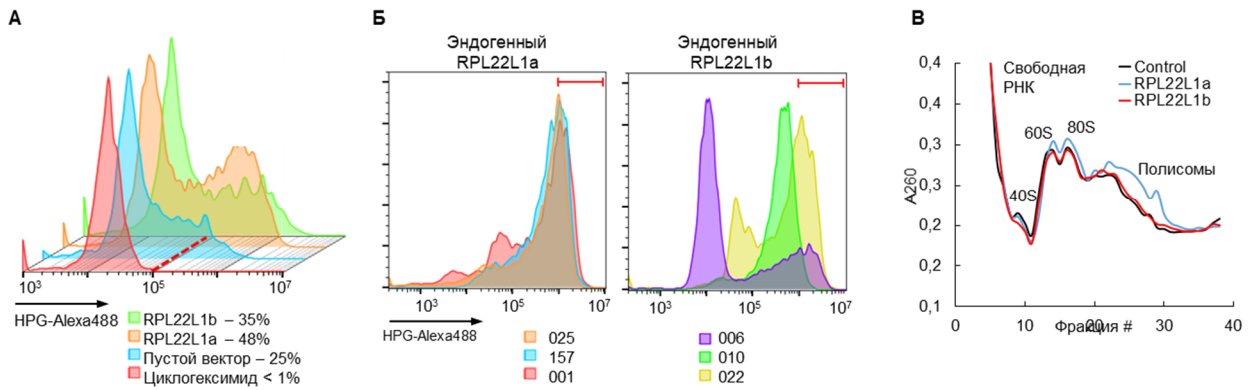


Рис. 15. *А* – Анализ включения L-гомопропаргилглицина во вновь синтезированные белки в первичных культурах 022 GBM с оверэкспрессией изоформ RPL22L1 или пустого вектора методом проточной цитофлуориметрии. Отрицательным контролем служили клетки 022 GBM, которые в течение 30 минут обрабатывались циклогексимидом (100 мг/мл). *Б* – То же, но для первичных культур GBM с эндогенными изоформами RPL22L1. *В* – Полисомный профиль первичной культуры 1079 GBM с оверэкспрессией изоформ RPL22L1.

Далее мы исследовали, как RPL22L1a может регулировать трансляцию ко-преципитировавших с ним мРНК. Для этого среди транскриптов, взаимодействующих с RPL22L1a, мы выбрали мРНК белков, участвующих в пути p53: TP53 и CDK5, а также важных для стволовости клеток ALDH3A2 и RPN2. Используя qRT-PCR, мы подтвердили

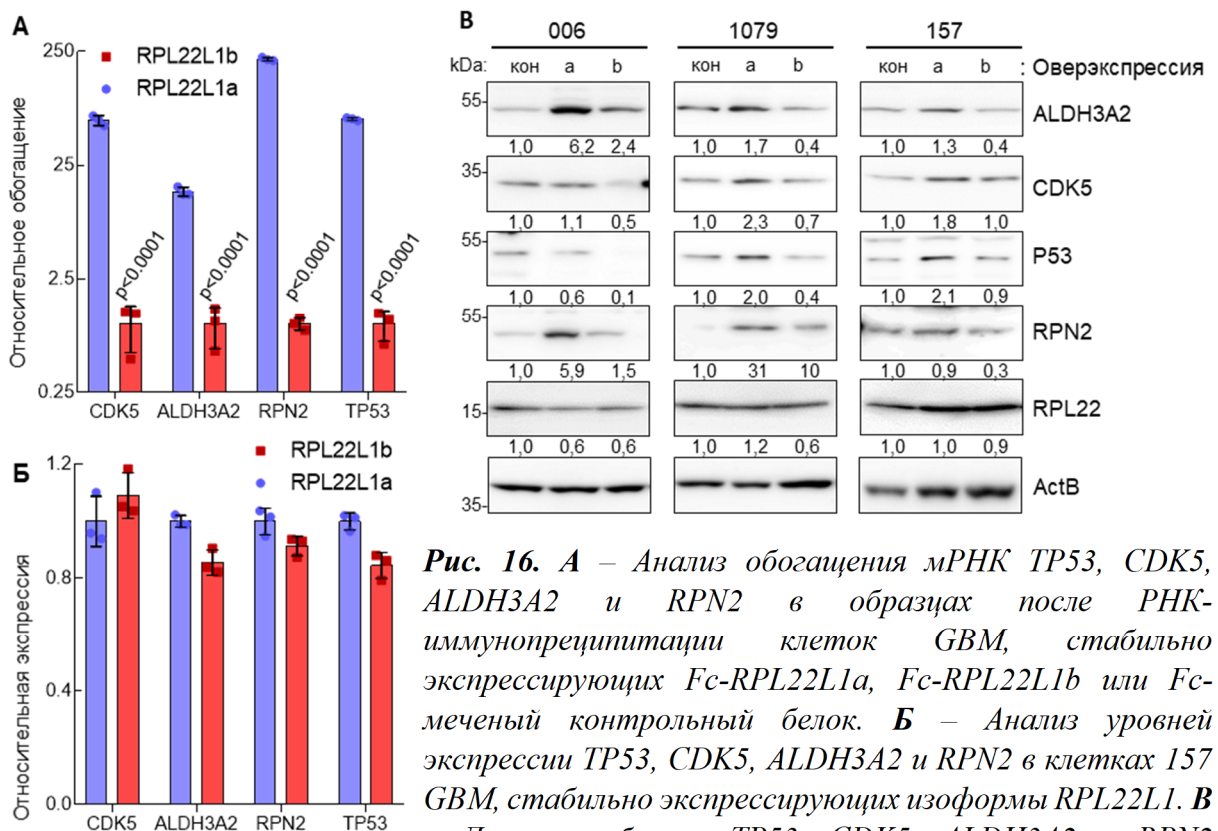


Рис. 16. *А* – Анализ обогащения мРНК TP53, CDK5, ALDH3A2 и RPN2 в образцах после РНК-иммунопреципитации клеток GBM, стабильно экспрессирующих Fc-RPL22L1a, Fc-RPL22L1b или Fc-меченый контрольный белок. *Б* – Анализ уровней экспрессии TP53, CDK5, ALDH3A2 и RPN2 в клетках 157 GBM, стабильно экспрессирующих изоформы RPL22L1. *В* – Детекция белков TP53, CDK5, ALDH3A2 и RPN2 методом иммуноблоттинга в клетках GBM, стабильно сверхэкспрессирующих RPL22L1a, RPL22L1b или пустой вектор (контроль).

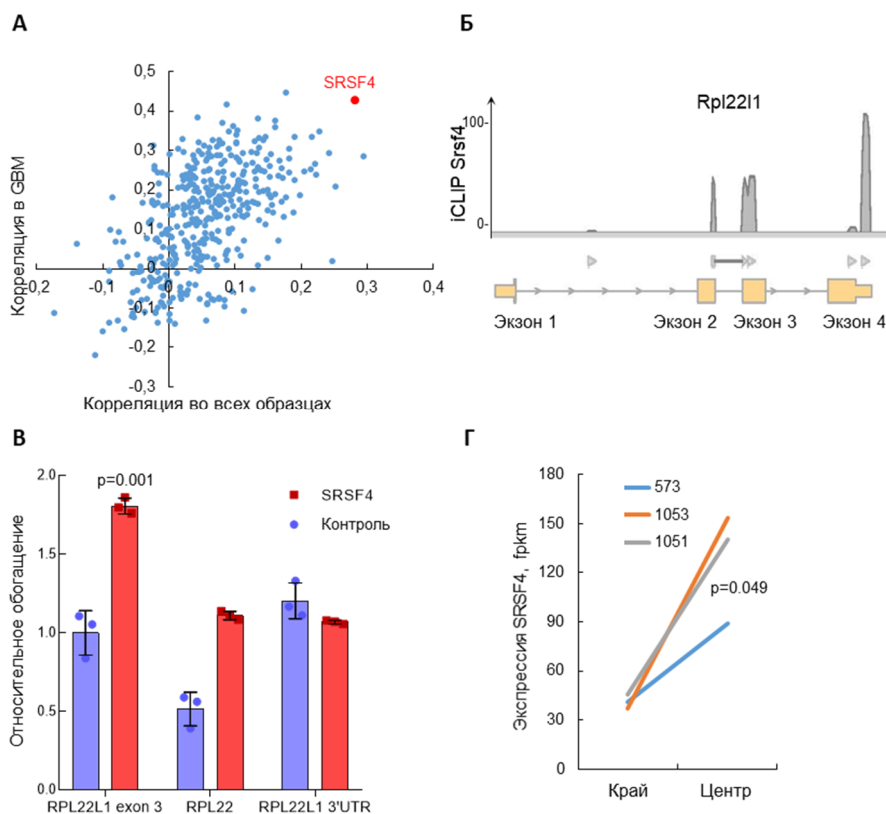
взаимодействие этих транскриптов с RPL22L1a, но не с RPL22L1b (рис. 16А). Важно отметить, что мы не обнаружили каких-либо изменений в количестве соответствующих мРНК в клетках при сверхэкспрессии RPL22L1a или RPL22L1b (рис. 16Б). Таким образом, можно заключить, что RPL22L1a не влияет ни на экспрессию, ни на стабильность этих транскриптов. Затем мы проверили, как изоформы RPL22L1 влияют на уровни соответствующих белков. С помощью иммуоблотинга лизатов нейросфер мы показали, что сверхэкспрессия RPL22L1a приводит к повышению уровней белков TP53, CDK5, ALDH3A2 и RPN2 по сравнению с контрольными клетками или клетками, сверхэкспрессирующими RPL22L1b (рис. 16В).

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

3. Изучение механизмов регуляции сплайсинга пре-мРНК RPL22L1

Далее мы исследовали механизм регуляции сплайсинга пре-мРНК RPL22L1. Анализ базы данных TCGA выявил высокую корреляцию между повышенным соотношением изоформ RPL22L1b/RPL22L1a и экспрессией фактора сплайсинга SRSF4 (рис. 17А). Белок SRSF4 является членом семейства SR-белков, которые участвуют как в конститутивном, так и в альтернативном сплайсинге. Анализ ранее опубликованных данных iCLIP для SRSF4 подтвердил, что этот белок связывается с пре-мРНК RPL22L1 на границе 2-го и 3-го экзонов (рис. 17Б) – той самой областью, которой различаются мРНК RPL22L1a и RPL22L1b (рис. 3А). Чтобы подтвердить эти данные, мы провели РНК-иммуопреципитацию, трансдуцировав клетки GBM лентивирусами, кодирующими Fc-SRSF4 или контрольный вектор. Результаты продемонстрировали относительно слабое, но статистически значимое обогащение мРНК RPL22L1 в образцах с Fc-SRSF4 (рис. 17В). Следует отметить, что мы наблюдали обогащение только для той области мРНК RPL22L1, которая соответствует 3-му экзону, включение которого предположительно регулируется SRSF4, но не для 3'UTR-области мРНК RPL22L1, которая расположена на 2000 нуклеотидов ниже соответствующего сайта сплайсинга.

Рис. 17. А – Анализ корреляции между соотношением изоформ RPL22L1b/RPL22L1a и уровнем экспрессии различных факторов сплайсинга. Ось X показывает коэффициент корреляции для образцов всех типов рака (n = 7631), ось Y представляет коэффициент корреляции для образцов



GBM ($n = 154$). **Б** – Результаты *iCLIP*, иллюстрирующие область связывания белка SRSF4 с пре-мРНК RPL22L1. По оси X – выравнивание результатов РНК-секвенирования на геномную последовательность RPL22L1, по оси Y – количество прочтений (ридов). **В** – Результаты *qRT-PCR* образцов РНК, которые взаимодействовали с Fc-меченым SRSF4 (красным цветом) или контрольным белком (синим цветом), с использованием праймеров к 3-му экзону RPL22L1, 3'UTR RPL22L1 или RPL22. **Г** – Анализ количеств мРНК SRSF4 в парных образцах тканей GBM, выделенной из краевых и центральных областей опухолей.

Так как изоформа RPL22L1b возникает при закислении рН микроокружения, логично предположить, что в этих условиях также должна повышаться и экспрессия SRSF4. Чтобы оценить присутствие SRSF4 в разных зонах опухоли, мы проанализировали наши данные РНК-секвенирования и продемонстрировали, что уровень SRSF4 значительно повышен в образцах из центра опухоли по сравнению с их парными образцами с периферии (**рис. 17Г**). Очень важно, что паттерн экспрессии SRSF4 выглядел почти идентичным паттерну экспрессии RPL22L1b в соответствующих образцах (**рис. 4Б**).

Чтобы получить прямые доказательства того, что SRSF4 экспрессируется на уровне белка в областях GBM с закисленным микроокружением, мы провели иммуногистохимическое окрашивание тканей GBM, взятых из зон опухоли с разным внеклеточным рН. Наши данные продемонстрировали, что белок SRSF4 детектировался исключительно в кислых областях опухоли (**рис. 18А**). Мы подтвердили эти результаты *in vitro*, показав, что культивирование нейросфер GBM в кислой среде приводит к увеличению экспрессии SRSF4 (**рис. 18Б**).

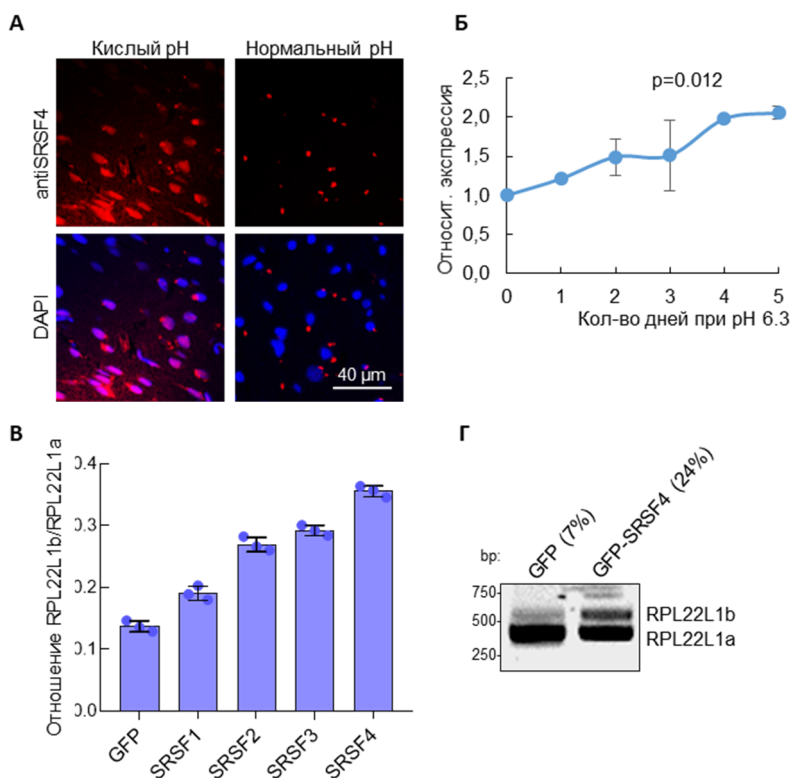


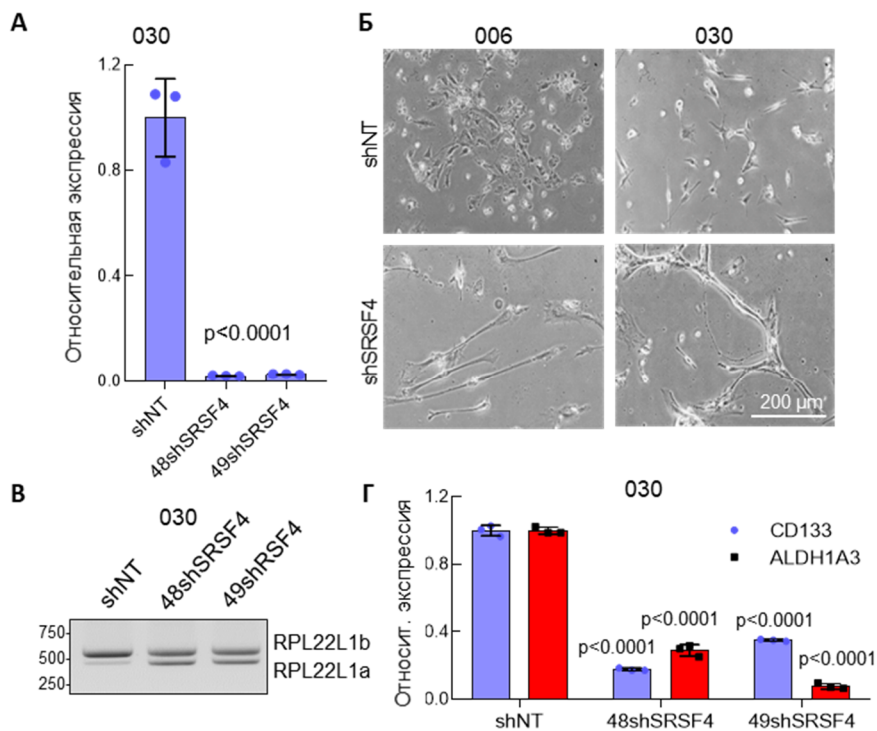
Рис. 18. **А** – Иммуногистофлуоресцентное окрашивание образцов биопсии опухоли GBM полученных из участков с низким рН и нормальным рН от одного и того же пациента с использованием антител к SRSF4 (красный) и красителя DAPI (синий). **Б** – Анализ экспрессии SRSF4 в клетках GBM, культивируемых на среде с низким рН (рН 6,0) в течение указанного количества дней. **В** – Анализ соотношения изоформ RPL22L1b/RPL22L1a в клетках U87MG, трансфицированных плазмидами, кодирующими контрольный белок (GFP) и белки SRSF1, SRSF2, SRSF3 и

SRSF4. **Г** – Анализ экспрессии изоформ RPL22L1 клетках 157 GBM, которые были трансфицированы плазмидами, кодирующими GFP или GFP-SRSF4; GFP⁺ популяции были выделены на клеточном сортере.

Чтобы непосредственно подтвердить, что SRSF4 смещает сплайсинг пре-мРНК RPL22L1 в сторону образования RPL22L1b, мы трансфецировали клеточную линию U87MG GBM плазмидами, кодирующими белки SRSF1, SRSF2, SRSF3 и SRSF4, которые принадлежат к одному семейству факторов сплайсинга. Согласно результатам проведенной ОТ-ПЦР, все изученные белки действительно увеличивают количество транскрипта RPL22L1b, однако SRSF4 оказывал самый сильный эффект (**рис. 18В**). Это наблюдение было подтверждено с использованием первичных культур GBM (**рис. 18Г**).

Чтобы дополнительно подтвердить участие SRSF4 в появлении RPL22L1b, мы провели нокдаун SRSF4 в клетках 030 и 006 GBM с подтвержденным «коровым» фенотипом (**рис. 19А**). Интересно, что трансдукция лентивирусами, кодирующими shSRSF4, привела к резким изменениям морфологии клеток: они значительно увеличились в размерах и приобрели веретенообразную форму, весьма нехарактерную для GBM (**рис. 19Б**). Как и ожидалось, снижение экспрессии SRSF4 привело к смещению сплайсинга в сторону образования изоформы RPL22L1a (**рис. 19В**). В соответствии с этим наблюдением, qRT-PCR выявил снижение экспрессии стволовых маркеров CD133 и ALDH1A3 в культуре 030 клеток GBM (**рис. 19Г**).

Рис. 19. **А** – Анализ эффективности нокдауна SRSF4 в клетках, трансдуцированных лентивирусами, кодирующими контрольную shRNA (shNT) или две разными shRNA, комплементарные SRSF4 (48shSRSF4 и 49shSRSF4). **Б** – Микрофотографии клеток GBM, трансдуцированных лентивирусами, кодирующими контрольную shRNA (shNT) или shRNA, комплементарные SRSF4. **В** – Анализ сплайсинга RPL22L1 в клетках GBM, трансдуцированных лентивирусами, кодирующими контрольную shRNA (shNT) или двумя разными shRNA, комплементарными SRSF4 (48shSRSF4 и 49shSRSF4). **Г** – Анализ экспрессии CD133 и ALDH1A3 в 030 клетках GBM, трансдуцированных лентивирусами аналогично «В».



Наконец, мы проверили влияние нокдауна SRSF4 на пролиферацию клеток *in vitro*. Мы продемонстрировали, что подавление экспрессии SRSF4 в клетках GBM с «коровым» фенотипом (030 GBM) почти полностью ингибировало их рост (**рис. 20А**), в то время как в клетках с «краевым» фенотипом (157 GBM) нокдаун SRSF4 оказывал гораздо менее выраженный эффект (**рис. 20Б**).

Чтобы определить клиническую значимость SRSF4, мы оценили его связь с выживаемостью пациентов. Анализ базы данных REMBRANDT показал, что экспрессия SRSF4 коррелировала с плохим прогнозом у пациентов с GBM и глиомами низкой степени (рис. 20B), что согласуется с данными, полученными для RPL22L1b (рис. 5B).

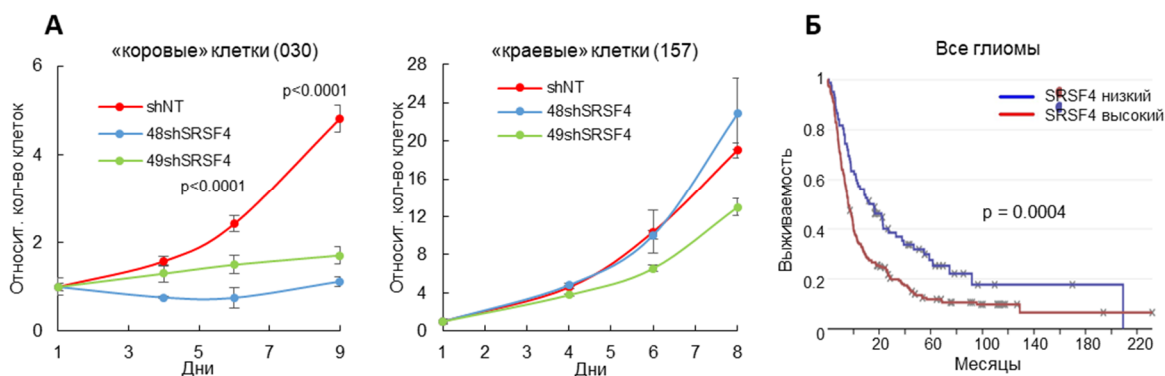


Рис. 20. *А* – Анализ пролиферации клеток *in vitro*, трансдуцированных лентивирусами, кодирующими контрольную *shRNA* (*shNT*) или двумя разными *shRNA*, комплементарными *SRSF4* (*48shSRSF4* и *49shSRSF4*). *Б* – Кривая Каплана-Майера, показывающая общую выживаемость пациентов с глиомой в зависимости от уровня экспрессии *SRSF4*.

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

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

В заключение мы решили определить, может ли фармакологическое ингибирование SRSF4 изменять сплайсинг RPL22L1, и таким образом оказывать противоопухолевый эффект. В настоящее время не обнаружено ингибиторов, действующих непосредственно на представителей семейства SRSF. Однако повлиять на их функционирование можно за счет ингибирования активности протеинкиназ, участвующих в фосфорилировании SR-белков, которое необходимо для регуляции их внутриклеточного транспорта. К таким киназам относятся семейства CDC-подобных киназ (Clk) и NIMA-родственных киназ 2 (Nek2).

На основании этих литературных данных нами были выбраны несколько веществ, которые оказывают влияние на сплайсинг: CMP3a (высокоспецифичный ингибитор киназы Nek2); соединения EY404 (Ey) и FG1059 (Fg) (двойные ингибиторы киназ Clk1/4, представляющие собой структурные аналоги, отличающиеся наличием amino- или нитрогруппы соответственно); пладиенолид Б (Pl-B) (блокирует активность сплайсосомы, напрямую связываясь с белком SF3B1). Оценив воздействие этих соединений на сплайсинг пре-мРНК RPL22L1, мы обнаружили, что Fg1059 приводит к наиболее значительным изменениям (рис. 21А, Б). Этот результат был подтвержден с использованием трех первичных культур GBM. С помощью секвенирования по Сэнгеру мы установили, что под действием Fg1059 в образующемся транскрипте происходит полный пропуск третьего экзона – именно того, которым различаются изоформы RPL22L1a и RPL22L1b (рис. 21В).

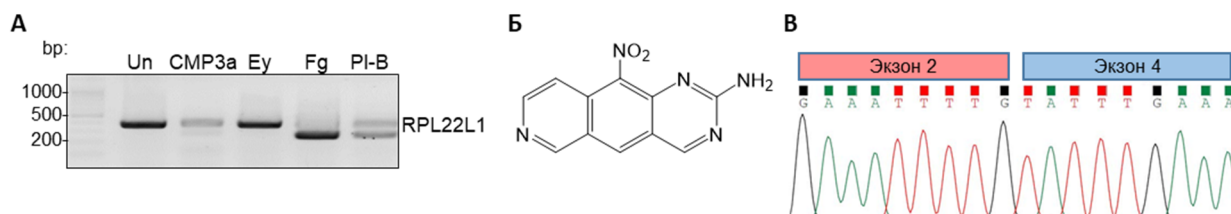


Рис. 21. *А* – Анализ экспрессии изоформ RPL22L1 в первичных культурах GBM, которые не обрабатывались веществами (Un) или обрабатывались в течение 24 часов соединениями: CMP3a (ингибитор киназы Nek2); EY404 (Ey) и FG1059 (Fg); ингибитором сплайсинга пладиенолидом Б (PI-B). *Б* – Структурная формула Fg1059. *В* – Результаты секвенирования по Сэнгеру изоформы RPL22L1, образующейся после обработки клеток FG1059.

Чтобы подтвердить, что изменения сплайсинга RPL22L1 вызваны нарушениями в фосфорилировании SRSF4, мы изучили фосфопротеом нейросфер GBM, обработанных FG1059 в течение 0, 3, 6 и 12 часов. LC-МС/МС-масс-спектрометрия выделенных фосфопептидов и последующий анализ полученных данных методом главных компонент (PCA) показали, что наиболее значительные различия в уровнях фосфорилирования белков наблюдались через 3 часа после добавления Fg1059 (**рис. 22**). Этот результат вполне ожидаем, поскольку на раннем этапе мы, вероятно, наблюдаем прямой эффект действия FG1059, в то время как более длительная инкубация может приводить к активации компенсаторных сигнальных путей и апоптотических каскадов. Далее мы провели анализ обогащения белков, на фосфорилирование которых влияет FG1059. Наши результаты показали, что через 3 часа наиболее значительные различия наблюдались для путей процессинга и сплайсинга пре-мРНК и затрагивали белки, содержащие мотив распознавания РНК (включая белок SRSF4). Интересно, что при 12-ти часовой инкубации мы наблюдали обогащение по путям Rho-ГТФаз и белкам, содержащим РН-подобные домены, которые важны для многих клеточных процессов, таких как пролиферация, инвазия и секреция веществ. Таким образом, эти результаты указывают на то, что основным процессом, на который воздействует FG1059, действительно является сплайсинг пре-мРНК, а SRSF4 представляет собой одну из его мишеней.

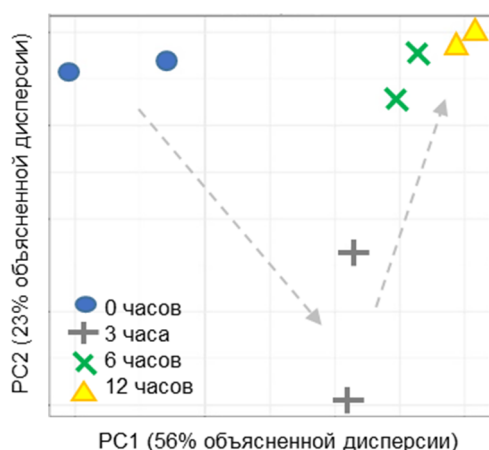


Рис. 22. Анализ методом главных компонент фосфопротеомных данных, полученных с помощью LC-MS/MS-масс-спектрометрии фосфопептидов, выделенных из клеток 157 GBM, обработанных 3 мкМ FG1059 в течение 0, 3, 6 и 12 часов.

Так как Clk-киназы контролируют активность SRSF-белков за счет регуляции их внутриклеточной локализации, мы изучили влияние FG1059 на распределение SRSF4 внутри клетки. Для этого мы трансфецировали клетки U87MG плазмидой, кодирующей фьюжен-белок RFP-SRSF4, и обнаружили, что обработка FG1059 вызывает транслокацию SRSF4 из ядра в цитоплазму, тем самым ингибируя связанную со сплайсингом активность SRSF4 (**рис. 23А**).

Затем мы проверили влияние FG1059 на жизнеспособность первичных культур GBM и нормальных астроцитов человека *in vitro*. FG1059 убивал клетки GBM с $IC_{50} < 500$ нМ, тогда как его цитотоксичность в отношении нормальных астроцитов была заметно ниже (**рис. 23Б**). Интересно, что клетки, экспрессирующие эндогенный RPL22L1b, оказались более устойчивыми к FG1059, чем клетки, экспрессирующие изоформу RPL22L1a. Это наблюдение хорошо согласуется с данными, представленными на **рисунке 12**, где мы продемонстрировали, что RPL22L1b, но не RPL22L1a, повышает эффективность сплайсинга. Следовательно, разумно предположить, что RPL22L1b лучше защищает клетки GBM от действия FG1059, который нарушает сплайсинг РНК.

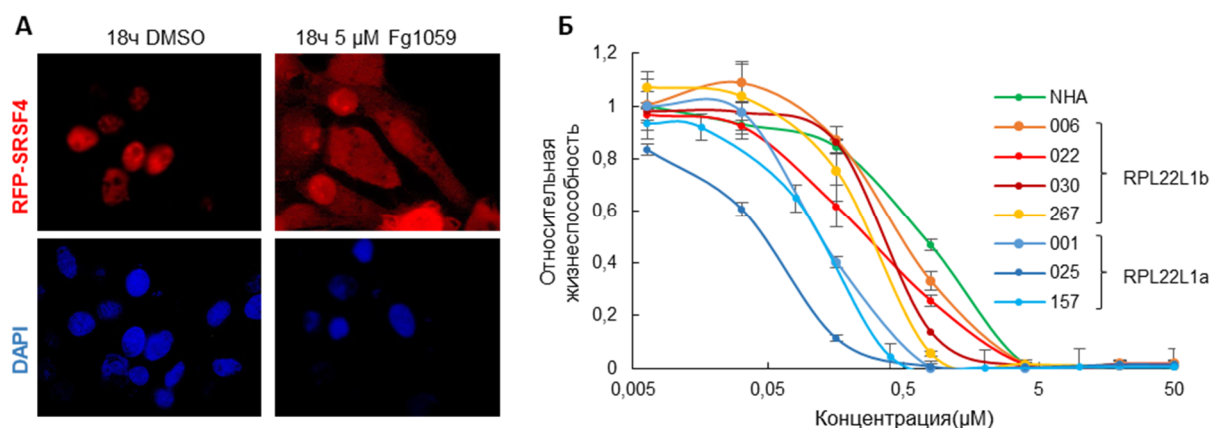


Рис. 23. А – Флуоресцентные микрофотографии клеток GBM, трансфицированных плазмидой, кодирующей RFP-SRSF4, и впоследствии обработанных 5 мкМ FG1059 в течение 18 часов. ДНК окрашивали DAPI. Б – *In vitro* анализ жизнеспособности клеток GBM и нормальных астроцитов человека (NHA), которые обрабатывались различной концентрацией FG1059 в течение 5 дней. Указаны клетки, преимущественно экспрессирующие изоформу RPL22L1a (001, 025, 157) и RPL22L1b (006, 022, 030, 267).

Ранее в нашей лаборатории было установлено, что ингибиторы сплайсинга, применяемые в сублетальных концентрациях, могут значительно повысить эффективность обычных противоопухолевых препаратов. Поэтому мы изучили возможное взаимное усиление действия FG1059 и темозоломида – основного химиотерапевтического препарата, используемого для лечения пациентов с GBM (**рис. 24**). Согласно нашим данным, FG1059 снижал жизнеспособность клеток GBM, обработанных темозоломидом, почти в два раза. Таким образом, соединение Fg1059 потенциально может использоваться в комбинации с этим препаратом для лечения GBM.

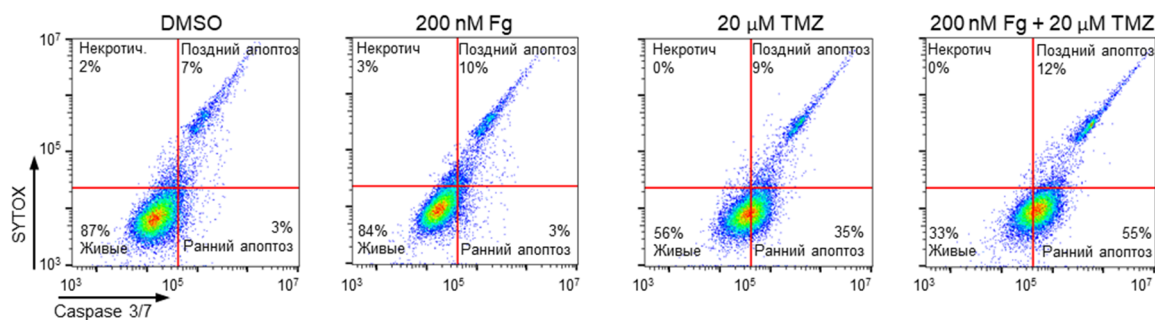


Рис. 24. FACS-анализ активности каспазы 3/7 и окрашивание SYTOX клеток 157 GBM, обработанных DMSO; 0,2 мкМ FG1059; 20 мкМ TMZ или обоими соединениями одновременно в течение 24 часов.

Наконец, мы оценили противоопухолевую эффективность FG1059 *in vivo*, используя иммунодефицитных мышей, в мозг которым вводили полученные от пациента клетки GBM. Согласно нашим данным, внутрибрюшинная инъекция FG1059 в концентрации 10 мг/кг, каждые три дня в течение двух недель существенно уменьшала процент пролиферирующих клеток (оценивался по интенсивности окраски на Ki67⁺) и стволовых клеток глиомы (оценивался по интенсивности окраски на ALDH1A3⁺) в опухоли (рис. 25А, Б и В). Кроме того, введение FG1059 в течение 15 дней статистически значимо продлевало жизнь животных (рис. 25Г).

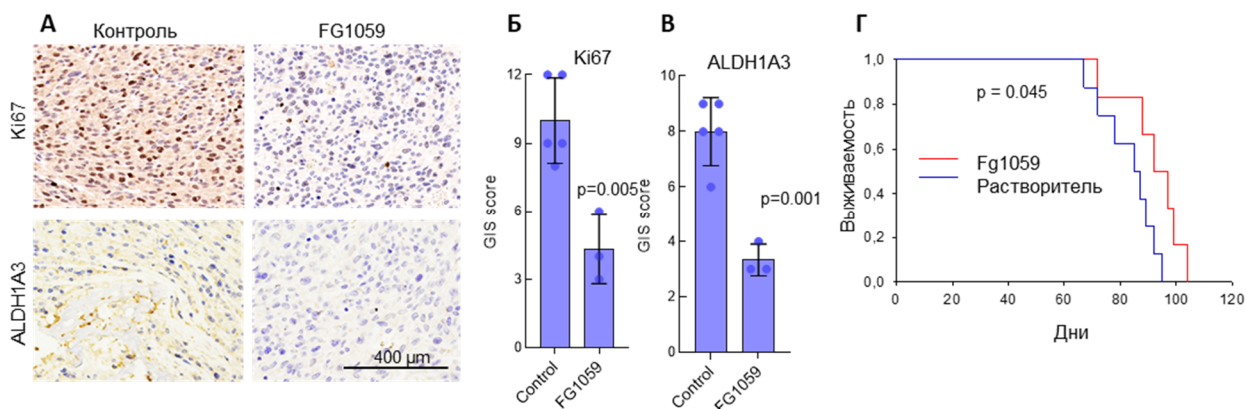


Рис. 25. А – Иммуногистохимическое окрашивание срезов ксенотрансплантантных опухолей с антителами к Ki67 и ALDH1A3. Б - Количественное определение иммуногистохимического окрашивания на Ki67 образцов из «А» (проводилось с помощью German immunohistochemical scoring system). n = 5 мышей в контрольной группе и n = 3 мыши в группе, получавшей FG1059. В – Количественное определение иммуногистохимического окрашивания на ALDH1A3 аналогично «Б». Г – Кривые Каплана-Майера, демонстрирующие выживаемость иммунодефицитных мышей, в мозг которым были трансплантированы клетки GBM человека; через месяц после трансплантации мышам в течение 15 дней вводили Fg1059 или растворитель.

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

Принимая во внимание все результаты, описанные в данной работе, можно предположить новый молекулярный механизм возникновения внутриопухолевой гетерогенности GBM (рис. 26). Движущей силой этого процесса служит закисление центральной зоны опухоли, которое происходит во время роста GBM. Оно усиливает экспрессию фактора сплайсинга SRSF4, который переключает сплайсинг пре-мРНК рибосомного белка RPL22L1 в сторону образования изоформы RPL22L1b. Эта изоформа не может связываться с рибосомой из-за измененной структуры С-конца, хотя N-концевая часть сохраняет способность взаимодействовать с молекулами РНК. RPL22L1b вызывает деградацию длинной некодирующей РНК MALAT1. Уменьшение уровня MALAT1, а также вызванные отсутствием RPL22L1a изоформы снижение интенсивности трансляции и понижение количества TP53 провоцируют более агрессивный фенотип GBM, характерный для клеток в центре опухоли. В результате, в разных областях глиобластомы возникают

фенотипически различные популяции клеток GBM, которые в конечном итоге увеличивают гетерогенность GBM и способствуют агрессивности опухоли.

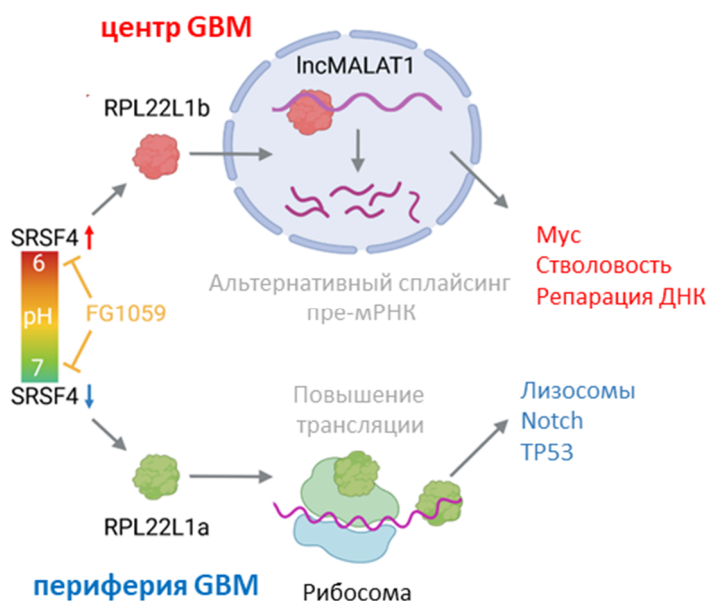


Рис. 26. Иллюстрация предлагаемого молекулярного механизма регуляции пространственного фенотипа клеток глиобластомы изоформами RPL22L1.

Заключение.

Согласно нашим результатам, популяции клеток GBM, существующие в центре и на периферии опухоли, отличаются друг от друга по белковому составу рибосом. Это может являться одной из причин низкой корреляции между различиями на уровнях транскриптома и протеома, детектированными при сравнении данных клеток.

Мы показали, что различия в составе рибосом в клетках GBM вызваны альтернативным сплайсингом пре-мРНК рибосомных белков. Наибольшие отличия как на уровне белка, включённого в рибосомы, так и на уровне сплайсинга пре-мРНК наблюдались для белка RPL22L1. Мы обнаружили, что альтернативный сплайсинг пре-мРНК RPL22L1 приводит к возникновению двух изоформ, RPL22L1a и RPL22L1b, последняя из которых описана нами впервые.

Мы продемонстрировали, что RPL22L1a присутствует в клетках, культивируемых при нормальных условиях, а изоформа RPL22L1b появляется в ответ на закисление внеклеточной среды. Эти данные были подтверждены на первичных культурах GBM *in vitro*, а также на образцах тканей пациентов GBM, полученных с помощью новейшего метода pH-взвешенной молекулярной МРТ из зон опухоли с разным внеклеточным pH.

Нами были подробно исследованы функции изоформ RPL22L1 в клетках GBM. Согласно нашим данным, RPL22L1a входит в состав рибосомы и увеличивает общий уровень трансляции, а также усиливает трансляцию специфических мРНК, которые непосредственно взаимодействуют с этим белком. Напротив, RPL22L1b не является компонентом рибосомы и принимает участие в деградации длинной некодирующей РНК MALAT1, которая ранее была описана в качестве важного регулятора сплайсинга. Понижая уровень MALAT1, RPL22L1b способствует увеличению стволовости клеток GBM и приобретению ими более агрессивного фенотипа.

Данные последующих экспериментов позволили установить, что сплайсинг пре-мРНК RPL22L1 регулируется белком SRSF4. Мы показали, что закисление микроокружения в центральной части GBM способствует повышению экспрессии SRSF4,

что, в свою очередь, переключает сплайсинг пре-мРНК RPL22L1 в сторону образования RPL22L1b.

Наконец, мы обнаружили низкомолекулярное соединение Fg1059, которое ингибирует киназы сплайсосомных белков семейства Clk и таким образом снижает фосфорилирование SRSF4, нарушая сплайсинг пре-мРНК RPL22L1. Всё это, в конечном счете, вызывает гибель клеток GBM *in vitro* и замедляет рост опухоли *in vivo*.

Вышеперечисленные данные позволили нам предложить новый механизм возникновения внутриопухолевой гетерогенности GBM, основанный на влиянии микроокружения опухоли на сплайсинг пре-мРНК рибосомальных белков.

ВЫВОДЫ

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

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

- 1) **Larionova T.D.**, Bastola S., Aksinina T.E., Anufrieva K.S., Wang J., Shender V.O., Andreev D.E., Kovalenko T.F., Arapidi G.P., Shnaider P.V., Kazakova A.N., Latyshev Y.A., Tatarskiy V.V., Shtil A.A., Moreau P., Giraud F., Li C., Wang Y., Rubtsova M.P., Dontsova O.A., Condro M., Ellingson B.M., Shakhparonov M.I., Kornblum H.I., Nakano I., Pavlyukov M.S. Alternative RNA splicing modulates ribosomal composition and determines the spatial phenotype of glioblastoma cells. *Nat Cell Biol*, 2022, V. 24, no. 10, P. 1541-1557.
- 2) **Ларионова Т.Д.**, Коваленко Т.Ф., Шахпаронов М.И., Павлюков М.С. Прогностическая значимость белков-регуляторов сплайсинга РНК для пациентов с глиобластомой. *ДАН. Науки о жизни*, 2022, Т. 503, № 1, стр. 166-171.
- 3) Kovalenko T.F., Yadav B., Anufrieva K.S., Rubtsov Y.P., Zatsepin T.S., Shcherbinina E.Y., Solyus E.M., Staroverov D.B., **Larionova T.D.**, Latyshev Y.A., Shakhparonov M.I., Pandey A.K., Pavlyukov M.S. Functions of long non-coding RNA ROR in patient-derived glioblastoma cells. *Biochimie*, 2022, V. 200, P. 131-139.
- 4) Коваленко Т.Ф.*, **Ларионова Т.Д.***, Антипова Н.В., Шахпаронов М.И., Павлюков М.С. Некодирующие РНК в патогенезе глиальных опухолей. *Acta Naturae*, 2021, Т. 13, № 3, с. 28 – 41. * - **равный вклад**
- 5) Antipova N.V., **Larionova T.D.**, Siniavin A.E., Nikiforova M.A., Gushchin V.A., Babichenko I.I., Volkov A.V., Shakhparonov M.I., Pavlyukov M.S. Establishment of Murine Hybridoma Cells Producing Antibodies against Spike Protein of SARS-CoV-2. *Int J Mol Sci*, 2020, V. 21, no. 23, P. 9167.
- 6) Pestov N.B., Kalinovsky D.V., **Larionova T.D.**, Zakirova A.Z., Modyanov N.N., Okkelman I.A., Korneenko T.V. Properties of a cryptic lysyl oxidase from haloarchaeon *Haloterrigena turkmenica*. *Peer J*, 2019, V. 7, P. e6691.