

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В. ЛОМОНОСОВА

МЕДИЦИНСКИЙ НАУЧНО-ОБРАЗОВАТЕЛЬНЫЙ ИНСТИТУТ

ФАКУЛЬТЕТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ

На правах рукописи

Первушин Николай Викторович

**Механизмы приобретенной устойчивости опухолевых клеток к антагонистам
Mcl-1 и MDM2 и способы ее преодоления**

1.5.22 Клеточная биология

1.5.4 Биохимия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:

доктор биологических наук

Копеина Гелина Сергеевна

Москва – 2025

Оглавление

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	6
ВВЕДЕНИЕ.....	10
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	19
1.1. Типы программируемой клеточной гибели	19
1.2. Апоптоз	20
1.3. Белки семейства Bcl-2	24
1.3.1. Проапоптотические эффекторные белки.....	25
1.3.2. Антиапоптотические белки.....	26
1.3.3. Проапоптотические Bcl-2-only белки.....	27
1.3.4. Взаимная регуляция белков семейства Bcl-2	28
1.4. Белки семейства Bcl-2 в качестве мишеней противоопухолевой терапии ...	29
1.4.1. Спектр действия Bcl-2-миметиков	30
1.4.2. Подавление белка Bcl-2.....	33
1.4.3. Трудности с ингибированием Bcl-xL	35
1.4.4. Таргетирование белков Bcl-w и Bfl-1	35
1.5. Mcl-1 – особенный белок семейства Bcl-2	36
1.5.1. Непрямые ингибиторы Mcl-1 (транскрипционный уровень).....	39
1.5.2. Непрямые ингибиторы Mcl-1 (трансляционный уровень)	41
1.5.3. Непрямые ингибиторы Mcl-1 (посттрансляционный уровень)	42
1.5.4. Создание прямых ингибиторов Mcl-1	43
1.6. Перспективные ингибиторы Mcl-1 и рациональные комбинации с их участием	49

1.7. Предикторные маркеры чувствительности и устойчивости к антагонистам Mcl-1	53
1.8. Белок-белковые взаимодействия p53 и MDM2 как мишень противоопухолевой терапии	56
1.8.1. Белок p53: строение и функции «стража генома»	56
1.8.2. MDM2: строение и функции регулятора p53	58
1.9. Стратегии таргетирования p53 в зависимости от его статуса	59
1.9.1. Ингибирование MDM2: активация p53 дикого типа в опухолевых клетках.....	60
1.9.2. Активация мутантного p53 в опухолевых клетках	62
1.9.3. Рациональные комбинации с участием ингибиторов MDM2	65
1.9.4. Устойчивость опухолевых клеток к ингибированию MDM2	67
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	70
2.1. Материалы	70
2.1.1. Буферные и рабочие растворы	70
2.1.2. Реактивы	71
2.1.3. Антитела	72
2.1.4. Клеточные культуры.....	72
2.1.5. Обработка клеток	72
2.1.6. Снижение уровня белка за счет РНК-интерференции	73
2.2. Методы	74
2.2.1. Культивирование клеток	74
2.2.2. Экспериментальные процедуры	74
2.2.3. Трансфекция клеток.....	74

2.2.4. Вестерн-блот анализ	75
2.2.5. Проточная цитофлуориметрия	76
2.2.6. ПЦР в реальном времени	77
2.2.7. Оценка метаболизма клеток.....	79
2.2.8. Получение нокаутных клеток методом CRISPR/Cas9	79
2.2.9. Оценка жизнеспособности клеток (MTS-тест).....	80
2.2.10. Тест на клоногенную активность	81
2.2.11. Секвенирование нового поколения (NGS).....	81
2.2.12. Анализ данных TCGA	81
2.2.13. Исследование клинических образцов	82
2.2.14. Биоинформатический анализ аминокислотных замен.....	83
2.2.15. Моделирование опухоли у мышей.....	83
2.2.16. Гистологический анализ тканей	84
2.2.17. Обработка данных.....	85
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ.....	86
3.1. Сравнительный анализ проапоптотической активности антагонистов Mcl-1 S63845 и A1210477.....	86
3.2. Оценка роли проапоптотических белков семейства Bcl-2 в различной эффективности действия антагонистов Mcl-1 S63845 и A1210477	88
3.3. Изучение механизмов устойчивости опухолевых клеток к действию антагониста Mcl-1 S63845	96
3.4. Оценка эффективности применения антагонистов Bcl-2 и Bcl-xL для преодоления устойчивости опухолевых клеток к ингибированию Mcl-1	106

3.5. Оценка белков семейства Bcl-2 в качестве потенциальных прогностических маркеров аденокарциномы легкого.....	112
3.6. Оценка эффективности совместного использования антагонистов Mcl-1 и MDM2.....	116
3.7. Изучение механизмов устойчивости опухолевых клеток к действию ингибитора MDM2 RG7388	123
3.8. Обнаружение мутаций в гене TP53 в опухолевых клетках с повышенной устойчивостью к RG7388 и их биоинформатический анализ	127
3.9. Оценка эффективности применения антагониста Mcl-1 S63845 и химиопрепаратов (Цисплатина и Доксорубицина) для преодоления устойчивости опухолевых клеток к действию RG7388	131
3.10. Оценка эффективности применения Доксорубицина для преодоления устойчивости клеток SH-SY5Y к RG7388 в <i>in vivo</i> модели.....	136
3.11. Оценка метаболизма и пролиферативной активности опухолевых клеток с повышенной устойчивостью к RG7388 в моделях <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i>	138
3.12. Оценка биологической активности новых производных имидазолина как новых антагонистов MDM2	141
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	148
ГЛАВА 5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	159
ВЫВОДЫ	161
СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ РАБОТЫ	162
СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	164

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

Araf-1 (Apoptotic protease activating factor 1) – активирующий апоптотическую протеазу фактор 1

Bad (Bcl-2-associated agonist of cell death) - Bcl-2-ассоциированный агонист клеточной гибели

Bak (Bcl-2 homologous antagonist killer) - гомологичный антагонист/киллер Bcl-2

Bax (Bcl-2 associated x protein) - Bcl-2-ассоциированный белок X

Bcl-B (B-cell lymphoma 2 family protein resembling Bcl-2) - белок семейства B-клеточных лимфом 2, напоминающий белок Bcl-2

Bcl-2 (B-cell lymphoma-2) – антиапоптотический белок одноименного семейства, маркер В-клеточной лимфомы-2

Bcl-xL (B-cell lymphoma-extra large) – очень большой белок В-клеточной лимфомы

Bcl-w (B-cell lymphoma-w) – белок-w В-клеточной лимфомы

Bfl-1 (Bcl-2-related isolated from fetal liver-11) - Bcl-2-родственный белок, выделенный из фетальной печени-11

Bid (BH3 Interacting Domain Death Agonist) – BH3-связывающий домен смерти агонист

Bim (Bcl-2-interacting mediator of cell death) – Bcl-2-взаимодействующий медиатор гибели клеток

BH-домен (Bcl-2 homology domain) – Bcl-2 гомологичный домен

Bok (Bcl-2-related ovarian killer) – Bcl-2-родственный киллер яичников

CAD (caspase-activated DNase) – ДНКаза, активируемая каспазами

CD20 (cluster of differentiation 20) – кластер дифференцировки 20

CDK (cyclin-dependent kinase) – циклин-зависимая киназа

DISC (death-inducing signaling complex) – сигнальный комплекс, активирующий клеточную гибель

DUB3 (deubiquitinating enzyme 3) – деубиквитирующий фермент 3

ERK (Extracellular Signal-regulated Kinases) – киназы, регулируемые внеклеточными сигналами

FADD (Fas-associated protein with Death Domain) – Fas-ассоциированный белок, содержащий домен смерти

GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) – глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа

GSK3 (Glycogen synthase kinase 3) – киназа 3 гликогенсинтазы

HER2 (human epidermal growth factor receptor-2) – рецептор 2 человеческого эпидермального фактора роста

ICAD (inhibitor of caspase-activated DNase) – ингибитор ДНКазы, активируемой каспазами

MAPK (Mitogen-activated protein kinase) – митоген-активируемая протеинкиназа

MDM2/HDM2 (Mouse/human double minute 2 homolog) – мышинный/человеческий гомолог «двойной минуты»

MDMX/MDM4 (Mouse double minute 4/X homolog) – мышинный гомолог «двойной минуты 4/X»

MDR1 (multidrug resistance protein 1) – белок множественной лекарственной устойчивости 1

MGMT (O⁶-alkylguanine DNA alkyltransferase) – O⁶-метилгуанин ДНК-метилтрансфераза

Mcl-1 (myeloid cell leukemia-1) – белок миелоидной лейкемии-1

Mule (Mcl-1 ubiquitin ligase E3) – Mcl-1 убиквитинлигаза E3

mTOR (mammalian target of rapamycin) – мишень рапамицина млекопитающих

Noxa (Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1) – Форбол-12-миристан-13-ацетат-индуцированный белок 1

PARP (PolyADP-Ribose Polymerase) – полиАДФ-Рибоза полимеразы

PD1 (programmed death 1) – рецептор программируемой смерти 1

PDL1 (programmed death ligand 1) – лиганд рецептора программируемой смерти 1

PEST-последовательности – последовательности, богатые пролином [P], глутаминовой кислотой [E], серином [S] и треонином [T]

PIDD (p53-induced protein with a Death Domain) – p53-индуцируемый белок, содержащий домен смерти

Puma (p53 upregulated modulator of apoptosis) – p53-индуцируемый модулятор апоптоза

RAIDD (receptor-interacting protein-associated ICH-1 homologous protein with a Death Domain) – рецептор-взаимодействующий белок, содержащий домен смерти и ассоциированный с ICH-1 гомологичным белком

SAHBs (stabilized α -helix of Bcl-2 domains) - стабилизированная α -спираль ВНЗ-домена

SMAC (second mitochondria-derived activator of caspases) – второй митохондриальный активатор каспаз

tBID (truncated Bid) – усеченная форма белка Bid

TRAIL (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand) – лиганд семейства факторов некроза опухолей, индуцирующий апоптоз

xIAP (X-chromosome linked inhibitor of apoptosis protein) – ингибитор апоптотического белка, связанный с X-хромосомой

USP9X (Ubiquitin Specific Peptidase 9 X-Linked) – X-связанная убиквитинспецифичная пептидаза 9

VEGF (Vascular endothelial growth factor) – фактор роста эндотелия сосудов

АТФ – аденозинтрифосфорная кислота

ММ – множественная миелома

миРНК – малые интерферирующие РНК

ОМЛ – острый миелобластный лейкоз

ОПЛ – острый промиелоцитарный лейкоз

ПААГ – полиакриламидный гель

ПВММ – пермеабилзация внешней мембраны митохондрий

ПКГ – программируемая клеточная гибель

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ХЛЛ – хронический лимфоцитарный лейкоз

ЭПР – эндоплазматический ретикулум

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

По данным Всемирной организации здравоохранения, онкологические заболевания занимают второе место среди основных причин смертности в мире. В 2020 году рак унес жизни около 10 млн человек [1,2]. Опухоли возникают в результате неконтролируемого процесса перерождения нормальных клеток в злокачественные клоны вследствие накопления мутаций в их генетическом материале [1]. В ходе канцерогенеза опухолевые клетки приобретают ряд отличительных черт, которые позволяют им ускользать от механизмов защиты организма и метастазировать, то есть проникать в окружающие ткани и соседние органы и там размножаться, что приводит к прогрессированию заболевания. Одной из таких особенностей является избегание активации программируемой клеточной гибели (ПКГ) [3–5]. Важнейшую роль в предотвращении опухолевой трансформации играет апоптоз, являющийся одним из наиболее изученных видов ПКГ. Нарушения механизмов запуска апоптотической гибели лежат в основе прогрессии многих типов рака, поэтому ее активация представляет собой перспективную стратегию противоопухолевой терапии [6].

Регуляция апоптоза осуществляется различными генами и их продуктами, среди которых особое значение имеют белки семейства Bcl-2 [7] и транскрипционный фактор p53 [8]. Первые представлены как анти-, так и проапоптотическими членами. Дисбаланс в уровнях экспрессии генов представителей данного семейства, в частности, повышенное содержание антиапоптотических белков, является распространенным механизмом устойчивости опухолевых клеток к индукции апоптоза [7]. Белок p53 поддерживает стабильность генома и тем самым препятствует образованию опухолей. Так, p53 предотвращает деление клеток с повреждениями ДНК и участвует в запуске различных видов ПКГ, включая апоптоз [9]. Мутации гена *TP53* обнаруживаются примерно в половине случаев развития онкологических заболеваний и в

большинстве своем приводят к потере функциональной активности p53. Опухоли, содержащие такой белок, характеризуются повышенной пролиферацией клеток и неблагоприятным прогнозом эффективности лечения [10,11]. Активация транскрипционного фактора p53 способствует усилению транскрипции и соответствующему увеличению уровней p53-зависимых проапоптотических белков (Bax, Puma, Noxa), что, в свою очередь, ведет к нейтрализации их антиапоптотических партнеров и запуску апоптоза в опухолевых клетках. Таким образом, подавление антиапоптотических белков семейства Bcl-2 и активация p53 являются привлекательными подходами в терапии онкологических заболеваний.

К настоящему моменту большие успехи были достигнуты по обоим направлениям. Несколько лет назад был разрешен для клинического применения селективный антагонист антиапоптотического белка Bcl-2 (Венетоклакс) [7]. Попытки создания эффективных ингибиторов Mcl-1 в течение многих лет были безуспешными. Настоящим прорывом стала разработка высокоселективного антагониста S63845. Сейчас его производное и ряд других антагонистов Mcl-1 проходят клинические испытания [12]. Также на пациентах исследуют большое количество соединений, ведущих к активации дикого типа p53, в частности, за счет ингибирования его негативного регулятора MDM2, который обеспечивает низкий внутриклеточный уровень p53. Так, например, активно изучается препарат RG7388 (Идасанутлин), антагонист MDM2 [8,13].

Существенной проблемой при использовании подавляющего большинства лекарственных препаратов, особенно противоопухолевых соединений целевого действия, становится развитие приобретенной лекарственной устойчивости к ним с последующей потерей эффективности [14]. Не являются исключением антагонисты Mcl-1 и MDM2, для которых также был отмечен подобный эффект [15,16]. Однако механизмы приобретенной устойчивости к ингибированию Mcl-1 и MDM2 остаются малоизученными. Понимание особенностей этих процессов, а также исследование возможных способов преодоления данного типа

резистентности может способствовать усовершенствованию современных тактик лечения онкологических заболеваний и приблизить их клиническое применение в будущем.

Цель исследования

Целью данной работы является установление причин приобретенной устойчивости опухолевых клеток к действию антагонистов Mcl-1 и MDM2 и поиск возможных стратегий ее преодоления.

Задачи исследования

1. Установление предикторных факторов, определяющих чувствительность опухолевых клеток к действию антагонистов Mcl-1.
2. Выявление потенциальных механизмов, лежащих в основе устойчивости опухолевых клеток к ингибированию Mcl-1, и анализ эффективности использования антагонистов Bcl-2 и Bcl-xL для преодоления данного типа устойчивости.
3. Определение прогностической значимости белков семейства Bcl-2 в качестве потенциальных маркеров аденокарциномы легкого.
4. Выявление потенциальных механизмов устойчивости опухолевых клеток к антагонистам MDM2.
5. Оценка эффективности использования антагониста Mcl-1 S63845 или ДНК-повреждающих агентов Цисплатина и Доксорубицина в комбинации с антагонистом MDM2 RG7388 для преодоления устойчивости опухолевых клеток к ингибированию MDM2.
6. Изучение биологической активности новых антагонистов MDM2.

Объект и предмет исследования

Для определения потенциальных механизмов приобретенной устойчивости опухолевых клеток к действию антагонистов Mcl-1 и MDM2 и способов ее преодоления, для оценки значимости белков семейства Bcl-2 в качестве

потенциальных прогностических маркеров аденокарциномы легкого и для анализа биологической активности новых антагонистов MDM2 в ходе работы были использованы клеточные линии нейробластомы (SH-SY5Y, SK-N-SH и SK-N-BE(2)c), аденокарциномы шейки матки (HeLa), аденокарциномы легкого (H23, U1810 и A549), аденокарциномы яичника (Caov-4), колоректального рака (RKO и HCT116).

Для определения прогностической значимости белков семейства Bcl-2 был использован клинический материал пациентов с аденокарциномой легкого, полученный в Национальном медицинском исследовательском центре (НМИЦ) онкологии им. Н.Н. Блохина. Соответствующие неопухолевые ткани, которые располагались вдали от участка опухоли, были охарактеризованы как нормальные эпителиальные клетки в ходе гистологического анализа. Образцы были получены в соответствии с принципами Комитета по этике НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина (разрешение № 04-04-08097).

Для оценки эффективности применения химиопрепарата Доксорубин с целью преодоления устойчивости клеток SH-SY5Y к антагонисту MDM2 RG7388 в *in vivo* модели были использованы самки мышей NSG (NOD/SCID/IL2rynull) массой 20–25 г, полученные из питомника лабораторных животных «Пушино» Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН (ИБХ РАН). Все процедуры были одобрены Институциональным комитетом по уходу и использованию животных ИБХ РАН (протокол №375/2023).

Научная новизна исследования

Применение ингибиторов Mcl-1 и MDM2 является новым и перспективным направлением в таргетной терапии онкологических заболеваний. Изучаемые в рамках данного проекта препараты были разработаны несколько лет назад и сейчас активно исследуются на различных стадиях клинических испытаний. В ходе исследований установлено, что белок Bcl-2 является важным предикторным маркером, который определяет чувствительность опухолевых клеток к действию

антагонистов Mcl-1. Были получены новые клеточные модели, характеризующиеся повышенной устойчивостью к действию антагонистов Mcl-1. В двух из них развитие резистентности к ингибированию Mcl-1 сопровождалось повышением уровней других антиапоптотических белков – Bcl-2 или Bcl-xL. Более того, совместное подавление Mcl-1 и Bcl-2 или Mcl-1 и Bcl-xL вело к преодолению устойчивости опухолевых клеток к действию антагонистов Mcl-1. Также было отмечено, что профиль экспрессии генов белков семейства Bcl-2 имеет важное прогностическое значение у пациентов с аденокарциномой легкого. В частности, наибольшая выживаемость наблюдалась у пациентов с пониженными уровнями Bcl-xL и Mcl-1 и повышенным уровнем Bax.

Впервые был показан синергетический эффект при совместном применении антагонистов Mcl-1 и MDM2 в опухолевой модели нейробластомы. Кроме того, была получена новая клеточная модель нейробластомы, характеризующаяся повышенной устойчивостью к действию антагонистов MDM2. Различными методами *in vitro* и *in silico* было определено, что причина резистентности клеток к ингибированию MDM2 заключается в появлении мутаций в структуре p53. Выявлено, что химиопрепараты Цисплатин и Доксорубин были менее эффективны в качестве индивидуальных соединений в клетках нейробластомы с приобретенной устойчивостью к RG7388 в *in vitro* и *in vivo* моделях. Однако Цисплатин или S63845 в комбинации с антагонистом MDM2 вели к частичному преодолению устойчивости к действию последнего. Наконец, было продемонстрировано наличие биологической активности у новых ингибиторов MDM2, являющихся модификациями препарата Нутлин-3а и обладающих улучшенными физико-химическими свойствами.

Теоретическая и практическая значимость исследования

Полученные данные о предикторных маркерах, определяющих чувствительность опухолевых клеток к ингибированию Mcl-1, а также *in vitro*, *in silico* и *in vivo* результаты, касающиеся механизмов приобретенной устойчивости к

действию антагонистов Mcl-1 и MDM2, могут внести существенный вклад в развитие современных подходов к лечению онкологических заболеваний. В частности, эти сведения позволяют оценить потенциальные преимущества и риски применения селективных ингибиторов Mcl-1 и MDM2. Кроме того, полученная информация может способствовать одобрению и рациональному использованию данных агентов в клинической практике в будущем. Прогностическое значение профиля экспрессии генов белков семейства Bcl-2 у пациентов с аденокарциномой легкого имеет большое значение в контексте развития подходов персонализированной медицины. Наличие биологической активности у новых производных Нутлина-3а, ингибиторов MDM2, обладающих повышенной растворимостью по сравнению с оригинальными соединениями из семейства нутлинов, значимо для усовершенствования стратегий получения водорастворимых лекарственных препаратов.

Методология исследования

В основе данной диссертационной работы лежат современные методы клеточной и молекулярной биологии и биохимии. Для выполнения поставленных целей и задач были использованы различные методологические подходы *in vitro*, *in vivo* и *in silico* при помощи релевантных методов статистической обработки данных.

Степень достоверности исследования

Работа выполнена на высоком научно-методическом уровне. Достоверность полученных данных подтверждена различными методами с проведением статистического анализа при помощи программного обеспечения (Microsoft Excel, GraphPad Prism 6, R3.6.1).

Положения, выносимые на защиту

1. Белки Вак, Vcl-xL и Vcl-2 являются предикторными факторами, определяющими чувствительность опухолевых клеток к действию антагонистов Mcl-1.
2. Повышение уровней антиапоптотических белков Vcl-2 или Vcl-xL лежит в основе развития приобретенной устойчивости опухолевых клеток к действию антагониста Mcl-1 S63845, а использование антагонистов белков Vcl-2 или Vcl-xL при совместном применении с S63845 ведет к преодолению устойчивости опухолевых клеток к ингибированию Mcl-1.
3. Повышенный уровень белка Вак совместно с пониженными уровнями Vcl-xL и Mcl-1 определяют благоприятный прогноз выживаемости пациентов с аденокарциномой легкого.
4. Развитие приобретенной устойчивости опухолевых клеток к действию антагониста MDM2 RG7388 связано с изменением структуры белка p53 вследствие появления замены His193Arg, ведущей к нарушению взаимодействия ДНК и p53 и снижению транскрипционной активности последнего.
5. ДНК-повреждающие агенты Цисплатин и Доксорубин обладают меньшей эффективностью в качестве индивидуальных соединений в клетках нейробластомы с приобретенной устойчивостью к действию антагониста MDM2 RG7388 *in vitro* и *in vivo*, а антагонист Mcl-1 S63845 или Цисплатин в комбинации с RG7388 обеспечивают частичное преодоление устойчивости клеток нейробластомы к действию последнего.
6. Новые антагонисты MDM2, являющиеся производными соединения Нутлин-3а, обладают биологической активностью и улучшенными физико-химическими свойствами по сравнению с Нутлином-3а.

Апробация результатов исследования

Результаты диссертационного исследования были представлены на 10 различных конференциях: 23-я международная Пушинская школа-конференция молодых ученых «Биология-наука 21 века» (апрель 2019, Россия), XXVI Международная научная конференция «Ломоносов» (апрель 2019, Москва, Россия), 27th Euroconference on Apoptosis «Cell Death and Regeneration» (сентябрь 2019, Дрезден, Германия), IV, V и VI Национальные конгрессы по регенеративной медицине (ноябрь 2019, 2022 (оба – Москва) и 2024 (Санкт-Петербург, Россия)), V Всероссийская конференция по молекулярной онкологии (декабрь 2019, Москва, Россия), V Всероссийский молодежный научный форум «Наука будущего – наука молодых» (декабрь 2020, Москва, Россия), 8th International Electronic Conference on Medicinal Chemistry (онлайн, ноябрь 2022, Швейцария), I Всероссийская научно-практическая конференция «Достижения и перспективы экспериментальной фармакологии в онкологии и радиационной медицине» (март 2024, Обнинск, Россия).

Работа диссертанта была отмечена следующими наградами: медаль Российской академии наук с премией для студентов высших учебных заведений России в области медицины в 2021 г., премия в конкурсе работ талантливых студентов, аспирантов и молодых учёных МГУ имени М.В. Ломоносова, учреждённого О.В. Дерипаской, в 2020 г., 2 место на конкурсе НИР студентов и аспирантов секции "Медицина и фармакология" V Всероссийского молодежного научного форума «Наука будущего – наука молодых» в 2020 г.

Личный вклад автора

Все этапы исследования были выполнены диссертантом лично или при его непосредственном участии. Диссертант сформулировал задачи исследования, провел анализ литературных данных, осуществил планирование экспериментов, подобрал методы, подходящие для выполнения поставленных задач, произвел

статистическую обработку и интерпретацию полученных результатов, сформулировал выводы, написал текст диссертации.

Публикации по теме диссертации

Результаты диссертационного исследования опубликованы в 11 статьях в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ имени М. В. Ломоносова по специальностям и отраслям наук. Список публикаций по теме диссертационной работы представлен в соответствующем разделе.

Кроме того, результаты диссертационной работы были отражены в двух патентах: 1) Патент № 2730497 от 24.08.2020 «2,4,5-три(метоксифенил) цис-имидазолины и способ их получения» (Базанов Д.Р., Лозинская Н.А., Первушин Н.В., Копеина Г.С., Аникина Л.В., Савицкая В.Ю., МаксUTOва А.И.); 2) Патент № 2809688 от 14.12.2023 «Новые азотзамещенные 2,4,5-три(метоксифенил) цис-имидазолины, способ их получения и применения» (Базанов Д.Р., Лозинская Н.А., Первушин Н.В., Копеина Г.С., Савин Е.В.).

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 191 странице машинописного текста, иллюстрирована 49 рисунками и 1 таблицей. Работа включает в себя введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, результаты и их обсуждение, выводы и список литературы, содержащий 279 источников, из которых 275 зарубежных и 4 отечественных.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Типы программируемой клеточной гибели

Первое описание процесса гибели клеток было сделано еще в середине XIX века. Однако только лишь спустя столетие начались подробные исследования в данной области знаний [17]. В 1951 году была предложена концепция деления клеточной гибели на три вида: филогенетическую, гистогенетическую и морфогенетическую [18]. Важнейшим событием стало выдвижение идеи о том, что гибель клеток является следствием активации особой генетической программы в 1966 году [19]. Годом ранее были получены первые экспериментальные данные, подтверждающие эту теорию, и был введен в обиход термин «программируемая клеточная гибель (ПКГ)» [20]. Наконец, в 1972 году Керр, Вилли и Карри подробно описывают особый тип ПКГ, который называют апоптозом [21]. Стоит заметить, что еще до появления этой прорывной публикации активно изучались механизмы гибели клеток под действием радиационного излучения. Большие успехи в этой области были достигнуты советскими учеными в 1970-е годы [22].

На сегодняшний день накоплен огромный пласт научных знаний по тематике ПКГ [23,24]. Так, сейчас выделяют свыше 10 видов ПКГ, а именно: апоптоз, некроптоз, ферроптоз, пироптоз, аутофагическую гибель и другие [25]. Все они имеют большое значение для нормального развития и функционирования биологических организмов. Процессы ПКГ участвуют в преобразовании тканей и органов живых существ в ходе онтогенеза [26,27]. Так, например, некроптоз необходим для поддержания гомеостаза Т-клеток [28]. Ферроптоз может быть ответственен, в частности, за нарушения работы нейронов [29]. Пироптоз обеспечивает защиту организма при обнаружении патогенов [30]. В нормальных условиях аутофагия позволяет утилизировать поврежденные белки и органеллы, однако в определенных случаях клетки погибают в результате деградации большинства мембранных органелл [31]. Важно отметить, что подавление ПКГ является одним из наиболее распространенных физиологических изменений,

способствующих развитию опухоли [3–5]. В настоящее время запуск различных типов ПКГ в опухолевых клетках является рациональной стратегией противораковой терапии [25].

1.2. Апоптоз

Как было отмечено выше, наиболее изученным видом ПКГ к настоящему моменту является апоптоз [24]. В ходе данного процесса клетки претерпевают большие изменения: их размеры уменьшаются с последующим распадом на отдельные фрагменты, называемыми апоптотическими тельцами, которые, в свою очередь, поглощаются макрофагами или другими окружающими клетками [32]. Таким образом, важнейшим отличием апоптоза от некроза является отсутствие воспалительного ответа, что обеспечивается за счет фагоцитирования апоптотических телец [32,33]. Их детектирование реализуется за счет появления на поверхности погибших клеток фосфатидилсерина, который в норме локализуется на внутренней поверхности плазматической мембраны [34,35].

Одними из ключевых участников апоптоза являются каспазы, представляющие собой семейство цистеиновых протеаз, способных расщеплять белки по остатку аспартата. Описано более 10 различных каспаз, которых разделяют по функциональной активности на две основные группы: первая участвует в развитии иммунного ответа (каспазы-1, -4, -5, -11), а вторая вовлечена в реализацию апоптотической гибели. Последняя группа, в свою очередь, формирует две подгруппы, включающие в себя инициаторные (-8, -9, -10) и эффекторные (-3, -6, -7) каспазы [36,37]. Отдельно выделяют каспазу-2, которая выполняет как инициаторные, так и эффекторные функции, в том числе реализуя запуск апоптоза в ответ на генотоксический стресс [38], и каспазу-14, которая важна для успешного созревания кератиноцитов [39].

К настоящему моменту выявлены два пути активации апоптоза: внешний и внутренний (Рис. 1). Внешний (рецептор-зависимый) путь запускается в результате связывания лигандов (например, TRAIL и CD95L) с «рецепторами смерти»

TRAILR и Fas/CD95 соответственно), располагающихся на поверхности клеток [33]. Взаимодействие лиганда с рецептором приводит к конформационному изменению последнего, что позволяет ему связываться с адаптерным белком, например, Fas-Associated protein with Death Domain (FADD) в случае рецептора Fas. Далее возможно присоединение инициаторной каспазы-8 (или инициаторной каспазы-10). Таким образом, происходит формирование комплекса death-inducing signaling complex (DISC), служащего платформой активации каспаз-8, -10. Связывание белков в комплексе DISC реализуется за счет гомотипических взаимодействий [39,40]. Кроме того, инициация рецептор-зависимого пути может происходить при недостаточной стимуляции «рецепторов зависимости», отвечающих за выживание, миграцию или дифференцировку клеток [41].

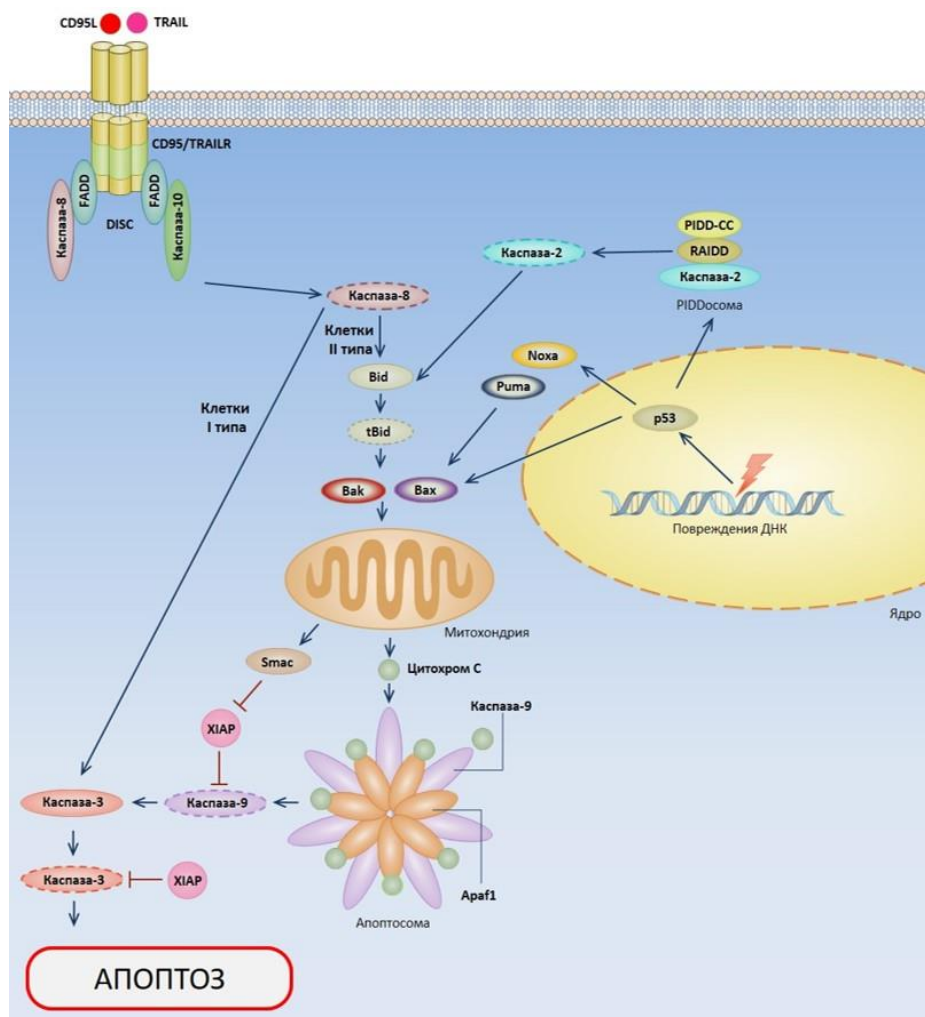


Рис. 1. Активация внешнего и внутреннего путей апоптоза (адаптировано из источника [42]).

Активированная каспаза-8 обеспечивает расщепление и активацию эффекторной каспазы-3. Стоит отметить, что такая прямая активация каспазы-3 происходит в клетках I типа, которые характеризуются высокой функциональной активностью комплекса DISC (Рис. 1). К этому типу относятся, к примеру, клетки иммунной системы - тимоциты. Для клеток II типа, характеризующихся низкой активностью этого комплекса вкупе с повышенным уровнем белка-ингибитора каспаз X-chromosome linked inhibitor of apoptosis protein (xIAP), активация каспазы-3 происходит за счет вовлечения внутреннего пути апоптоза при помощи каспаза-8-опосредованного расщепления проапоптотического белка ВН3 Interacting Domain Death Agonist (Bid), что будет описано далее (Рис. 1). Такой тип активации, например, свойственен клеткам печени - гепатоцитам [43,44].

В результате происходит появление каталитически активных фрагментов каспазы-3, запускающих эффекторную фазу апоптоза и участвующих в протеолизе различных внутриклеточных белков, среди которых можно выделить белки-регуляторы клеточной адгезии, белки цитоскелета и ядерной ламины [45]. Так, к примеру, происходит фрагментация ДНК за счет инактивации белка inhibitor of caspase-activated DNase (ICAD) и последующей активации белка caspase-activated DNase (CAD), обеспечивающего протекание этого процесса в ядре клеток [46]. Кроме того, субстратом каспазы-3 является белок репарации PolyADP-Ribose Polymerase (PARP) [47]. Степень процессинга каспазы-3 и расщепления белка PARP отражает интенсивность апоптотической гибели клеток, что используется для количественной оценки клеточной гибели при помощи Вестерн-блот анализа в рамках множества исследований, в том числе и данного [47,48].

В результате воздействия различных стрессовых сигналов (повреждение ДНК, нарушение нормальной работы митохондрий и других) может происходить запуск внутреннего (митохондриального) пути активации апоптоза. Например, при генотоксическом стрессе наблюдается p53-опосредованное формирование комплекса «PIDDосома», служащего для активации каспазы-2 и включающего в

себя также белки receptor-interacting protein-associated ICH-1 homologous protein with a Death Domain (RAIDD) и С-концевой фрагмент белка p53-induced protein with a Death Domain (PIDD-CC) [49,50]. Более того, непосредственное накопление активного p53 приводит к увеличению экспрессии генов проапоптотических белков семейства B-cell lymphoma-2 (Bcl-2): Bcl-2 associated X protein (Bax), p53 upregulated modulator of apoptosis (Puma), и Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1 (Noxa) [51].

Как отмечено ранее, важными регуляторами апоптоза являются члены семейства Bcl-2, среди которых выделяют проапоптотические и антиапоптотические белки. Первые способствуют гибели клеток и обеспечивают пермеабиллизацию внешней мембраны митохондрий (ПВММ), а вторые обеспечивают выживание клеток за счет блокирования действия первых [52,53]. Накопление каспаз-2, -8 в активированном состоянии ведет к протеолизу проапоптотического белка Bid с образованием укороченной формы truncated Bid (tBid), что, в свою очередь, обеспечивает активацию эффекторных белков Bcl-2 homologous antagonist killer (Bak) и Bax с последующей ПВММ [54]. Как было упомянуто, протеолиз белка Bid является возможной точкой пересечения внешнего и внутреннего путей активации апоптоза (Рис. 1). В ходе ПВММ из межмембранного пространства митохондрий в цитоплазму поступают цитохром *c* и белок second mitochondria-derived activator of caspases (SMAC). Цитохром *c* – один из важнейших участников электронно-транспортной цепи внутренней мембраны митохондрий. После выхода в цитоплазму он наряду с белком Apoptotic protease activating factor 1 (Araf-1) в присутствии дезоксиаденозинтрифосфата участвует в образовании апоптосомы – высокомолекулярной платформы активации инициаторной каспазы-9, которая затем активирует эффекторные каспазы-3 и -7 [55]. Белок SMAC устраняет действие белка XIAP, ингибитора как инициаторной (каспаза-9), так и эффекторных (каспазы-3, -7) каспаз, что приводит к усилению запуска апоптотической гибели [56,57].

Таким образом, вне зависимости от типа стрессового стимула в ходе апоптоза внутри клетки происходит интенсивный протеолиз белков-мишеней, разрушение ядерной ламинаы, фрагментация ДНК и реорганизация белков цитоскелета. В конце концов, этот процесс завершается этапом формирования апоптотических телец, утилизирующихся соседними тканями или макрофагами [34,58,59].

1.3. Белки семейства Bcl-2

Ген B-cell leukemia/lymphoma-2 (*BCL2*), обнаруженный в 1980-х в процессе изучения В-клеточных лимфом, впоследствии дал название целому белковому семейству, включающему в себя несколько десятков членов. Было показано, что при транслокации t(14;18), в результате которой ген *BCL2*, расположенный на хромосоме 18, переносится в транскрипционно активный локус гена тяжелой цепи иммуноглобулина, находящегося на хромосоме 14, наблюдается повышенная экспрессия гена антиапоптотического белка Bcl-2. Следствием этого, наряду с активацией некоторых онкогенов, является последующее ингибирование апоптотической гибели в мутантных клонах, их накопление и развитие онкологических заболеваний [60]. Как было отмечено ранее, по функциональным свойствам белки данного семейства делятся на проапоптотические и антиапоптотические. Первые, в свою очередь, подразделяются на две подгруппы: эффекторные и регуляторные белки. Согласно структурной классификации (Рис. 2), выделяют однодоменные и мультидоменные белки в зависимости от количества Bcl-2 homology domains (BH-доменов). Мультидоменные белки выполняют либо проапоптотические, либо антиапоптотические функции. К однодоменным белкам относятся регуляторные BH3-only белки [61,62].



Рис. 2. Схема строения членов белкового семейства Bcl-2. BH – BH-домен, TM – трансмембранный домен (опубликовано с модификациями в [7]).

1.3.1. Проапоптотические эффекторные белки

Основные представители данной группы – это мультидоменные порообразующие белки Bak и Bax, состоящие из четырех BH-доменов. Высоко консервативные домены BH1-3 служат для образования гидрофобного кармана, обеспечивающего связывание BH3-only белков. Выставленный наружу BH3-домен является важнейшим структурным элементом проапоптотических белков семейства Bcl-2. Необходимо отметить, что оба эффекторных белка имеют неустойчивую третичную структуру по сравнению с антиапоптотическими членами семейства. В результате взаимодействия с BH3-доменами других белков Bak и Bax способны экспонировать собственные BH3-домены, тем самым приобретая проапоптотические свойства [53].

Эффекторные белки имеют различную внутриклеточную локализацию: Bax располагается в цитоплазме, поскольку его трансмембранный домен (TM-домен) обращен внутрь BH3-связывающего кармана, а Bak – на поверхности наружной мембраны митохондрий за счет TM-домена. Неактивированные эффекторные белки Bak и Bax не способны образовывать поры, потому что их BH3-домены расположены внутри белка и недоступны для взаимодействия с другими молекулами Bak и Bax. После взаимодействия с tBid и проапоптотическими BH3-only белками оба белка экспонируют свои BH3-домены, а Bax перемещается к наружной митохондриальной мембране. Активированные Bak и Bax способны

образовывать димеры за счет взаимодействий ВНЗ-домен/ВНЗ-связывающий карман с последующим формированием высокомолекулярных гомо- и гетеро-олигомеров, являющихся структурной основой пор в наружной митохондриальной мембране [53,61,63]. В нормальных условиях внешняя мембрана митохондрий проницаема лишь для белковых молекул с молекулярной массой до 5 кДа, а в ходе процесса ПВММ образуются поры, способные пропускать в цитозоль крупные белки (массой свыше 100 кДа) [64].

Традиционно к порообразующим эффекторным белкам относят также Bcl-2-related ovarian killer (Bok). Однако его функциональная активность остается предметом научных споров. С одной стороны, он способен нейтрализовывать антиапоптотические белки семейства Bcl-2 и приводить к ПВММ подобно Bак и Bах. С другой стороны, он выполняет множество неапоптотических функций. В частности, Bok локализуется главным образом в эндоплазматическом ретикулуме (ЭПР) и участвует в регуляции внутриклеточного уровня кальция [65,66].

1.3.2. Антиапоптотические белки

К основным представителям этой группы относятся Bcl-2, B-cell lymphoma-extra large (Bcl-xL), Myeloid cell leukemia-1 (Mcl-1), B-cell lymphoma-w (Bcl-w) и Bcl-2-related isolated from fetal liver-11 (Bfl-1) [62]. Антиапоптотические белки препятствуют запуску апоптоза за счет связывания при помощи гидрофобного кармана, формируемого доменами ВН1-3, активированных мономеров Bак и Bах, а также ВН3-only белков [7,67]. ВН4-домен белка Bcl-2, вероятно, участвует в ингибировании кальций-опосредованной апоптотической гибели, происходящей при стрессе ЭПР, благодаря взаимодействию с inositol triphosphate receptor (IP3R) [68]. Также мутация этого домена может негативно влиять на стабильность белка Bcl-2 и препятствовать его связыванию с Bах [69].

Повышенная экспрессия генов антиапоптотических белков семейства Bcl-2 наблюдается в клетках гематологических и солидных опухолей различной этиологии. Так, для многих В-клеточных лимфом характерна повышенная

экспрессия гена белка Bcl-2, для аденокарциномы легкого, карциномы яичников, колоректального рака, рака шейки матки – Mcl-1, для множественной миеломы – Bcl-xL [70,71]. Было показано, что высокие уровни антиапоптотических белков коррелируют с неблагоприятным прогнозом выживаемости пациентов. Например, была обнаружена взаимосвязь между уровнем Mcl-1 и негативным прогнозом для пациентов с немелкоклеточным раком легкого [72]. Повышенная экспрессия гена белка Bcl-xL лежит в основе устойчивости к действию химиопрепаратов и увеличивает риски рецидива онкологического заболевания у пациенток с раком яичника [73].

Также к группе антиапоптотических белков относится B-cell lymphoma 2 family protein resembling Bcl-2 (Bcl-B), уровень которого высок в здоровых и злокачественных тканях. На сегодняшний день он является одним из наименее изученных представителей семейства Bcl-2. Bcl-B обладает двойственной функциональной активностью, проявляя про- и антиапоптотические свойства, что позволяет ему как способствовать, так и препятствовать опухолевому росту в различных типах рака. Эта особенность Bcl-B может быть связана с его негативной регуляцией на эпигенетическом уровне, нарушенной структурой вследствие генетических полиморфизмов, а также участием в контроле других типов ПКГ, в частности, аутофагии [74].

1.3.3. Проапоптотические BH3-only белки

BH3-only белки семейства Bcl-2 состоят только из одного BH домена (BH3-домен), что отражено в названии этой группы. По своим функциональным свойствам они подразделяются на две подгруппы: активаторы (напрямую активируют эффекторные белки Bak и Bax) и сенситизаторы (блокируют действие антиапоптотических представителей семейства Bcl-2 без прямой активации порообразующих белков). К первым относят Bcl-2-interacting mediator of cell death (Bim) и tBid (truncated Bid), а ко вторым – Bcl-2-associated agonist of cell death (Bad), Puma и Noxa [75]. Однако, согласно ряду работ, Puma и Noxa также способны

активировать эффекторные белки, поэтому предложенное разделение несколько условно. Стоит отметить, что эти белки являются р53-зависимыми: при накоплении р53 в клетках (например, в ответ на повреждения ДНК) происходит усиление транскрипции их генов [76,77].

Прогрессированию онкологических заболеваний может способствовать снижение уровней проапоптотических белков: как эффекторных (Bax), так и Bcl-2-only (Bim, Puma и других), что наглядно подтверждает значение членов семейства Bcl-2 в процессах канцерогенеза [78–81].

1.3.4. Взаимная регуляция белков семейства Bcl-2

Профили взаимодействия между представителями семейства Bcl-2 определяются различиями в последовательности аминокислотных остатков Bcl-2-связывающих карманов антиапоптотических и Bcl-2-доменов проапоптотических белков (Рис. 3). Основными партнерами эффекторного белка Bax являются Bcl-xL и Mcl-1, в то время как Bax и Bcl-2-only белки Puma, Bim и tBid способны взаимодействовать со всеми антиапоптотическими членами семейства Bcl-2 [73]. Noxa селективно блокирует Mcl-1 и Bfl-1, а Bad нейтрализует действие Bcl-w, Bcl-2 и Bcl-xL [82,83].

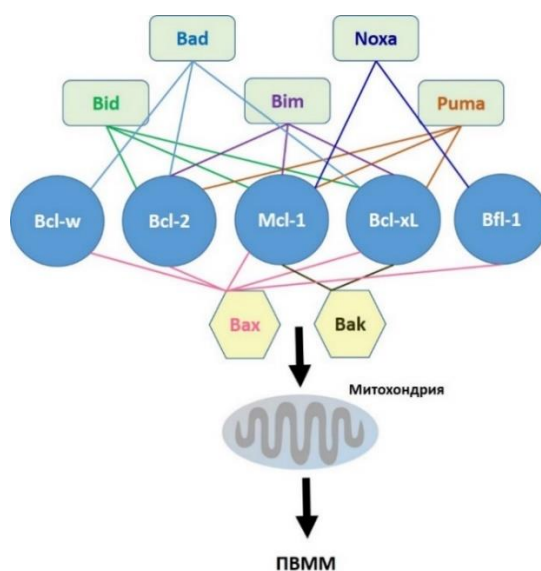


Рис. 3. Белок-белковые взаимодействия между различными группами семейства Bcl-2. Различные цвета линий (Bid – зеленый, Bad – голубой, Bim – фиолетовый, Noxa – синий, Puma –

коричневый, Вах – розовый, Вак – черный) показывают особенности профилей взаимодействия между проапоптотическими и антиапоптотическими белками. ПВММ – пермеабиллизация внешней мембраны митохондрий (опубликовано с модификациями в [12]).

Важно отметить, что посттрансляционные модификации могут менять профиль связывания белков. Например, в результате фосфорилирования у Bcl-2 повышается аффинность к Вак, что ведет к эффективному ингибированию последнего [84].

1.4. Белки семейства Bcl-2 в качестве мишеней противоопухолевой терапии

Как уже было отмечено ранее, в опухолевых клетках часто наблюдаются нарушения процессов запуска ПКГ, что может быть в том числе обусловлено изменениями в экспрессии генов членов семейства Bcl-2: повышением уровней антиапоптотических белков и снижением содержания проапоптотических белков. В связи с этим представляется перспективным для инициации ПКГ воздействовать на белковое семейство Bcl-2 по двум направлениям. С одной стороны, можно активировать эффекторные белки, с другой – нейтрализовывать действие антиапоптотических белков. Первый подход в настоящий момент находится в начальной стадии изучения. Его потенциальный недостаток – это вопрос селективности, поскольку в случае ее отсутствия активаторы порообразующих белков Вак и Вах могут привести к выраженной токсичности из-за запуска апоптоза в клетках здоровых тканей [67,85,86].

Более перспективным и эффективным на данный момент является второй подход, реализуемый посредством ингибирования антиапоптотических членов семейства Bcl-2. Серьезные успехи были достигнуты в области создания «ВНЗ-миметиков». Препараты данного класса можно назвать экзогенными аналогами ВНЗ-only белков, поскольку они подражают действию последних, связывая в гидрофобном кармане ВНЗ-домены антиапоптотических белков, нарушая их взаимодействия с эффекторными и ВНЗ-only белками и запуская тем самым апоптотическую гибель клеток [87,88].

1.4.1. Спектр действия ВНЗ-миметиков

Первые полученные ВНЗ-миметики (например, Обатоклакс) не обладали достаточной селективностью и могли подавлять несколько белков одновременно, эффективно запуская клеточную гибель в *in vitro* экспериментах. Данное обстоятельство обусловлено минимальными структурными различиями в связывающих карманах антиапоптотических членов семейства Bcl-2. Такие соединения широкого спектра действия продемонстрировали противораковую активность в *in vivo* моделях, однако показали низкую эффективность в клинических исследованиях [89].

В настоящий момент большой интерес вызывают селективные низкомолекулярные ингибиторы, появлению которых способствовало развитие и усовершенствование методов дизайна лекарственных соединений [90–92]. Специфичность действия этих препаратов по сравнению с предшественниками придает им ряд преимуществ, среди которых можно выделить повышенное сродство к целевому белку, а также возможность определения роли отдельных белков в выживаемости клеток, чтобы впоследствии подобрать соответствующие дозы антагонистов при необходимости ингибирования нескольких белков одновременно [7].

Важнейшим отличием любых противоопухолевых препаратов целевого действия от традиционных химиотерапевтических соединений (например, от ДНК-повреждающих агентов Цисплатина, Доксорубицина) является высокая селективность первых, позволяющая им избегать повреждения здоровых клеток организма. В случае ВНЗ-миметиков это достигается за счет нахождения злокачественных клеток в состоянии предварительной «готовности» к запуску апоптотической гибели («прайминга»), что не свойственно нормальным клеткам. Это состояние обеспечивается изменением уровней белков семейства Bcl-2. С одной стороны, под воздействием различных стрессовых стимулов в ходе опухолевого перерождения в раковых клетках наблюдается увеличение

содержания проапоптотических факторов (как порообразующих, так и ВНЗ-only белков). С другой стороны, для их нейтрализации и сохранения своей жизнеспособности отбираются такие мутантные клетки, в которых повышен уровень антиапоптотических белков. Таким образом, выживают клоны, которые характеризуются повышенным содержанием комплексов проапоптотических белков с антиапоптотическими. Поэтому добавление ВНЗ-миметиков ведет к разрушению этих комплексов и запускает апоптоз в них без повреждения нормальных клеток, не находящихся в состоянии «прайминга» (Рис. 4) [7,93–95].

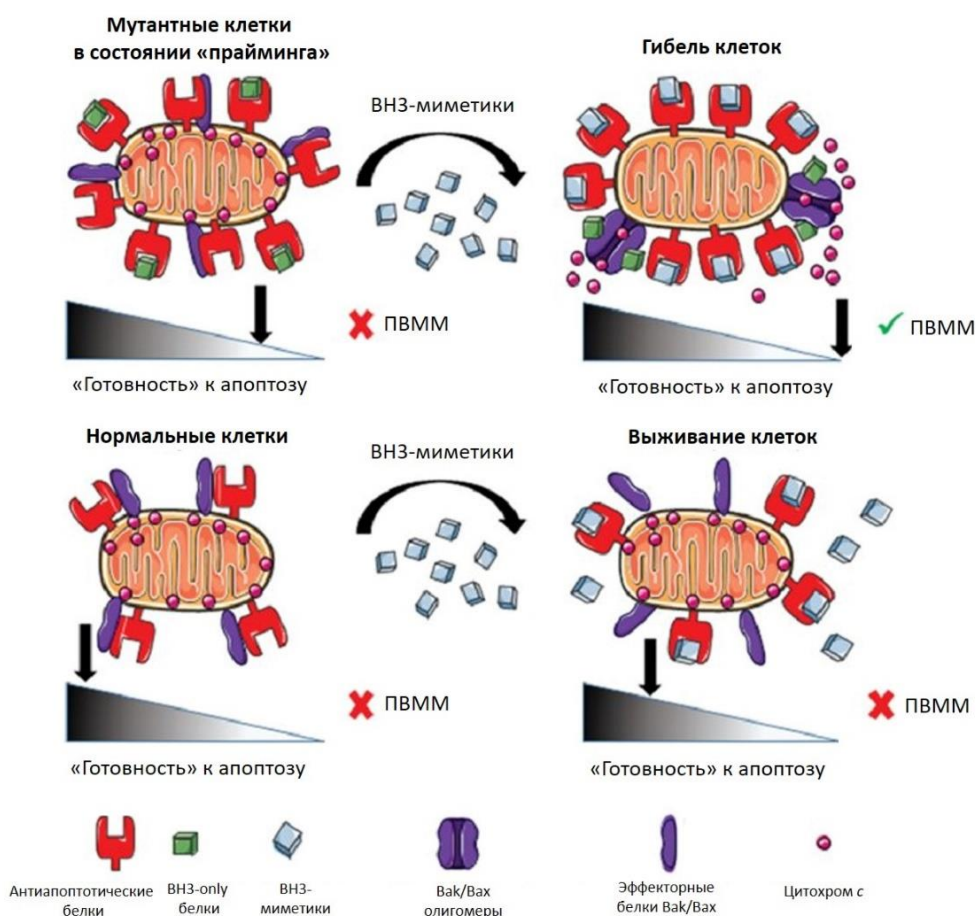


Рис. 4. Различия в чувствительности к апоптозу между опухолевыми клетками в состоянии «прайминга» и здоровыми клетками (адаптировано из источника [95]).

Однако стоит отметить особо, что ряд здоровых клеток, в частности, форменных элементов крови, также могут обладать высокой чувствительностью к ВНЗ-миметикам за счет нахождения их в состоянии «прайминга», что может приводить к серьезным побочным эффектам при использовании этих препаратов

[7,12,93,96]. Ярким примером этого является развитие тромбоцитопении при применении Навитоклакса [97,98].

Еще одним фактором, препятствующим эффективному действию ВНЗ-миметиков, может быть зависимость опухолевых клеток от нескольких антиапоптотических белков, что часто наблюдается в солидных опухолях. В таком случае необходимо применять комбинацию нескольких препаратов одновременно, что может привести к усилению токсичности. В то же время выживаемость многих гематологических опухолей определяется одним апоптотическим белком, что обуславливает высокую эффективность ВНЗ-миметиков в этих видах рака [94,99,100].

К актуальной задаче, направленной на расширение применения ВНЗ-миметиков, относится определение предикторных маркеров чувствительности опухолевых клеток к действию данной группы препаратов. То есть изучение зависимости различных видов онкологических заболеваний от отдельных антиапоптотических представителей белкового семейства Bcl-2. Одним из способов ее решения является метод ВНЗ-профайлинга [93–95]. Суть метода заключается в количественной оценке уровня ПВММ, происходящей в результате добавления ВНЗ-пептидов к злокачественным клеткам, полученным от пациентов с различными типами рака. Для его проведения необходимо получить соответствующий клинический материал, например, аспират костного мозга [101]. Другой модификацией ВНЗ-профайлинга является метод проточной цитофлуориметрии, в ходе которого происходит покраска антителами опухолевых маркеров, локализованных на поверхности злокачественных клеток. Если по результатам метода наблюдается значительный выход цитохрома *c* из межмембранного пространства с последующим развитием апоптоза при нейтрализации одного из антиапоптотических белков, то его ингибирование может быть эффективно в противоопухолевой терапии данного типа рака. К настоящему моменту была отмечена высокая прогностическая способность ВНЗ-профайлинга

в ответе клеточных линий на различные воздействия. Кроме того, он продемонстрировал корреляцию чувствительности к Венетоклаксу (антагонист Vcl-2, применяемый в клинической практике) у пациентов с острым миелобластным лейкозом (ОМЛ). Данный способ требует дальнейшего изучения для подтверждения своей эффективности в качестве рутинного метода лабораторной диагностики, однако уже сейчас можно отметить потенциальные перспективы использования ВНЗ-профайлинга в качестве стратегии персонализированной медицины в лечении онкологических заболеваний [7,94,95,101,102].

Другим способом прогнозирования ответа опухолевых клеток на добавление ВНЗ-миметиков может быть анализ уровней различных членов семейства Vcl-2. Высокий уровень целевого белка вкупе с низкими уровнями других антиапоптотических белков является предикторным маркером эффективности действия ВНЗ-миметика. Для Венетоклакса было показано, что ответ в моделях мелкоклеточного рака легкого и неходжкинских лимфом имеет положительную корреляцию с уровнем экспрессии гена белка Vcl-2. Более того, высокий уровень Vcl-2 и низкий уровень Vcl-xL коррелировали с противоопухолевой эффективностью этого препарата у пациентов с ОМЛ [90,101,103].

1.4.2. Подавление белка Vcl-2

Vcl-2 стал первым обнаруженным белком целого семейства, которому впоследствии «подарил» свое название, и является безусловным лидером в этой белковой группе по числу разработанных ингибиторов. Усилия различных научных коллективов по поиску эффективного блокатора Vcl-2 не прошли даром и завершились созданием первого ВНЗ-миметика, разрешенного к клиническому применению. Им стал Венетоклакс (АВТ-199). До его появления стоит отметить разработку двух неселективных ВНЗ-миметиков: АВТ-737 и Навитоклакс (АВТ-263) [90,104]. Эти соединения способны ингибировать белки Vcl-xL, Vcl-2 и Vcl-w в наномолярных концентрациях, однако обладают низкой аффинностью к Mcl-1 и

Vfl-1 [105]. Уникальность АВТ-737 заключается в том, что он стал первым ВНЗ-миметиком. АВТ-737 успешно преодолел доклинические испытания, однако неблагоприятные фармакологические свойства (низкая пероральная биодоступность) не позволили ему перейти к исследованиям в клинике. Навитоклакс был лишен этих недостатков, что позволило ему попасть на стадию клинических испытаний [90]. Как уже было отмечено, во время их проведения было обнаружено, что ингибирование Vcl-xL, необходимого для выживания тромбоцитов, ведет к выраженной тромбоцитопении. В конечном итоге это привело к снижению максимальной дозы препарата и, как следствие, ограниченной эффективности [67,97].

Для решения этой проблемы было необходимо разработать селективный ингибитор Vcl-2 со значительно меньшей побочной токсичностью, что привело к созданию Венетоклакса. Его структура сходна с АВТ-737 и Навитоклаксом, а селективное связывание с Vcl-2 обеспечивается за счет добавления индольного фрагмента и последующего образования водородной связи с остатком аспартата в положении 103, в то время как у Vcl-xL в сходной позиции располагается остаток глутаминовой кислоты в положении 96 [90]. После завершения клинических испытаний Венетоклакс был одобрен во многих странах, в том числе в РФ, для клинического применения в качестве монотерапии и в комбинации с Обинутузумабом/Ритуксимабом у пациентов с хроническим лимфоцитарным лейкозом (ХЛЛ)/лимфомой из малых лимфоцитов (ЛМЛ) как при наличии, так и при отсутствии делеции в хромосоме 17p, сопровождающейся потерей белка p53, а также в сочетании с Азацитидином или Децитабином или низкими дозами Цитарабина для лечения пациентов с ОМЛ [7]. Активно изучаются различные варианты комбинированной терапии с участием Венетоклакса: к настоящему моменту было запущено более 500 клинических исследований.

На сегодня также разработаны другие селективные антагонисты Vcl-2, такие как S55746 и Лизафтоклакс (APG-2575), которые активно изучаются в клинических

испытаниях и могут использоваться в будущем при возникновении приобретенной устойчивости к Венетоклаксу [106–110].

1.4.3. Трудности с ингибированием Vcl-xL

Vcl-xL также является привлекательной мишенью среди членов семейства Vcl-2, так как его уровень довольно высок во многих типах опухолей. Были разработаны различные соединения (S44563, WENI-539, A1331852, A1155463, Навитоклакс и другие), ингибирующие данный белок и показавшие свою эффективность в доклинических исследованиях [111]. Однако на сегодняшний день проведено очень мало испытаний на пациентах ввиду высокой токсичности, связанной с выраженной тромбоцитопенией, как это было подробно рассмотрено на примере Навитоклакса [67]. Важно, что развитие этого побочного эффекта наблюдалось в мышинной модели с участием антагониста A1155463, обладающего высоким сродством к Vcl-xL в пикомолярных концентрациях [91]. Для устранения этой проблемы предлагаются иные подходы по нейтрализации Vcl-xL, включающие в себя, к примеру, целевую доставку антагониста в опухоль при конъюгации с моноклональными антителами, что реализуется для препарата ABBV-155, уже исследуемого на пациентах [111,112]. Кроме того, была представлена вакцина Vcl-xl_42-CAF09b, состоящая из адьюванта (CAF09b) и пептидного фрагмента белка Vcl-xL (Vcl-xl_42), успешно проявившая себя на первой стадии клинических испытаний у пациентов с раком простаты [113]. Наконец, в ближайшее время будут запущены аналогичные испытания для препарата Пелцитоклакс, который является пролекарством, обладающим низкой способностью проникать в тромбоциты в неактивной форме и достигающим активного состояния только в опухолевых клетках [111,114].

1.4.4. Таргетирование белков Vcl-w и Vfl-1

Несмотря на установленную значимость белка Vcl-w в различных физиологических и патологических процессах, к настоящему моменту еще не разработаны селективные антагонисты этого белка [115]. Возможно, что это

связано с конформационной гибкостью данного белка [116]. Ранее уже было отмечено, что АВТ-737 и Навитоклак способны ингибировать Bcl-w, но делают это менее эффективно по сравнению с белками Bcl-xL и Bcl-2 [7,105].

Схожая ситуация наблюдается с белком Bfl-1. Недавно была показана его роль в процессах развития различных онкологических заболеваний, однако на данный момент отсутствуют сведения о селективных и эффективных ингибиторах этого белка [117]. Интересной особенностью Bfl-1 является наличие цистеинового остатка в ВНЗ-связывающем кармане белка, что является его отличительной чертой среди остальных антиапоптотических членов семейства Bcl-2 и может послужить основой для создания ингибиторов в будущем [7,118].

1.5. Mcl-1 – особенный белок семейства Bcl-2

Мультидоменный антиапоптотический белок Mcl-1 обладает рядом свойств, которые отличают его от остальных членов этой подгруппы семейства Bcl-2, и является перспективной мишенью противоопухолевой терапии [12,119]. Его ген (*MCL1*) стал первым, для которого была описана гомология с *BCL2*. Свое название он получил вследствие обнаружения в клеточной линии острого миелоидного лейкоза ML1. Его функции в качестве регулятора клеточной гибели были предсказаны уже в первой работе, посвященной его обнаружению [120].

Нокаут белка Mcl-1 ведет к эмбриональной летальности в периимплантационном периоде [121]. Кроме того, этот белок играет ключевую роль в развитии и регуляции гомеостаза гемопоэтических стволовых клеток, лимфоцитов, нейронов и других типов клеток [122–124]. Важно, что *MCL1* экспрессируется во всех тканях организма, что свидетельствует о его важной роли в нормальном функционировании тканей и после рождения [71]. Существует три изоформы белка Mcl-1 как варианты альтернативного сплайсинга - Mcl-1L, Mcl-1S и Mcl-1ES. Самой распространенной изоформой белка является Mcl-1L (Mcl-1 long – длинная изоформа), которую обычно называют Mcl-1 (в рамках данной работы Mcl-1L обозначается как Mcl-1). Этот белок расположен на наружной

митохондриальной мембране и, как уже было отмечено, проявляет антиапоптотическую активность. Две другие изоформы белка: Mcl-1S (short – короткая) и Mcl-1ES (extremely short – «сверхкороткая») выполняют проапоптотические функции, но на настоящий момент они мало изучены [12,119,125].

Mcl-1 превосходит по молекулярной массе (37,2 кДа) другие антиапоптотические белки благодаря наличию N-концевого домена, содержащего два региона богатых аминокислотными остатками пролина, глутаминовой кислоты, серина и треонина (PEST). Также этот домен содержит последовательность сигнала митохондриальной локализации [126]. PEST – распространенный мотив для белков с коротким «периодом жизни», к которым относится Mcl-1, что является его еще одной уникальной чертой. Свою стабильность этот белок сохраняет в течение нескольких часов в зависимости от действия различных внутриклеточных факторов [127].

Низкая стабильность Mcl-1 обусловлена наличием большого числа регуляторов данного белка на транскрипционном, трансляционном и посттрансляционном уровнях. Так, на транскрипционном уровне было обнаружено влияние на содержание Mcl-1 при действии преобразователя сигнала и активатора транскрипции 3 (STAT3). Были идентифицированы более 10 микроРНК, влияющие на уровень трансляции Mcl-1. Наконец, на посттрансляционном уровне контроль Mcl-1 осуществляют регуляторы протеасомной деградации (деубиквитиназы и убиквитинлигазы E3) [12,119,128–132]. Так, например, в нашей лаборатории было показано, что в условиях недостатка питательных веществ в опухолевых клетках происходит деградация белка Mcl-1, при этом данный эффект не связан с аутофагией, которая может активироваться в ответ на ограничение питательных веществ. Уровень Mcl-1 снижался в указанных условиях за счет его протеасомной деградации [133].

Белок Mcl-1 отличается также специфичным профилем взаимодействия с другими представителями семейства Bcl-2. Mcl-1 обладает большим сродством к порообразующему белку Bak и низким – к белку Bax [134]. Кроме того, белок Noxa является важнейшим регулятором Mcl-1. Как было упомянуто ранее, кроме Mcl-1, Noxa способен связываться только с белком Bfl-1. Noxa способствует протеасомной деградации Mcl-1, облегчая взаимодействие Mcl-1 и убиквитинлигазы Mcl-1 ubiquitin ligase E3 (Mule) и препятствуя образованию комплексов между Mcl-1 и деубиквитиной Ubiquitin Specific Peptidase 9 X-Linked (USP9X). При этом такой тип регуляции не наблюдается для других белков семейства Bcl-2 благодаря селективному связыванию Mule по отношению к Mcl-1 [131,135]. Таким образом, взаимодействие Noxa и Mcl-1 является еще одним примером посттрансляционной регуляции последнего.

Наличие амплификации *MCL1* показано в различных типах рака [136]. Более того, высокий уровень Mcl-1 способствует выживанию мутантных клеток и приводит к злокачественной трансформации за счет ингибирования апоптоза при некоторых гематологических (например, ОМЛ и множественной миеломе (ММ)) и солидных (например, при раке легких, молочной железы, яичников и шейки матки) опухолях [137–139]. Лекарственная устойчивость раковых клеток часто связана с повышенной экспрессией гена белка Mcl-1 [140–142]. При этом подавление Mcl-1 методом РНК-интерференции приводит к ингибированию опухолевого роста и гибели злокачественных клеток, характеризующихся повышенной экспрессией гена белка Mcl-1 [87,128,143,144].

Кроме антиапоптотической активности, Mcl-1 выполняет широкий спектр иных функций [119]. Во-первых, он может препятствовать процессу аутофагии за счет нейтрализации белка Beclin-1 [145]. Во-вторых, Mcl-1 участвует в поддержании митохондриального гомеостаза, контролирует процесс распада/слияния митохондрий, может регулировать окисление жирных кислот, а также блокировать митофагию (процесс селективной аутофагии митохондрий) за

счет взаимодействия с белком Parkin [119,146,147]. В-третьих, отмечена роль Mcl-1 в регуляции процессов репарации и клеточного цикла [148]. В-четвертых, он способствует метастазированию опухолевых клеток [149].

Таким образом, приведенные данные подтверждают значимость Mcl-1 в качестве мишени противораковой терапии. Однако его участие в неапоптотических процессах может препятствовать созданию эффективных ингибиторов и приводить к нежелательной токсичности [12].

Принимая во внимание особенности функционирования Mcl-1, можно предложить два основных подхода по нейтрализации этого белка: не прямое (подавление белка на транскрипционном, трансляционном и посттрансляционном уровнях регуляции) и прямое (использование селективных ВНЗ-миметиков) ингибирование (Рис. 5) [12].

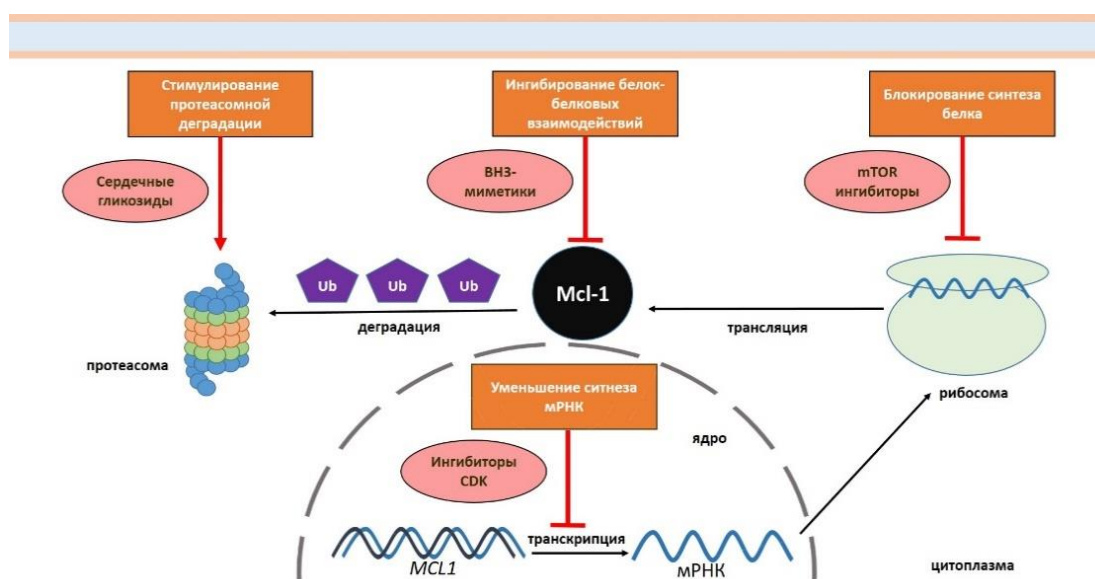


Рис. 5. Стратегии ингибирования Mcl-1. Ub – убиквитин (опубликовано с модификациями в [12]).

1.5.1. Непрямые ингибиторы Mcl-1 (транскрипционный уровень)

Основным способом подавления Mcl-1 на транскрипционном уровне является использование ингибиторов cyclin-dependent kinase (CDK), например, CDK9. Блокирование циклин-зависимых киназ выражается в подавлении

транскрипционной активности в клетках, что негативным образом влияет на короткоживущие белки, включая Mcl-1. В группу ингибиторов CDK входят различные вещества, в том числе природные флаваноиды и их синтетические производные (Вогонин, Флавопиридол, Воруциклиб и другие) [12].

Первым представителем этой группы, который был исследован в клинических испытаниях, стал Флавопиридол, представляющий собой неселективный блокатор различных циклин-зависимых киназ [150]. Несмотря на успешные результаты доклинических испытаний, он продемонстрировал ограниченную эффективность в испытаниях на пациентах и не был одобрен для клинического применения. Однако Флавопиридол по-прежнему исследуется в клинических испытаниях в комбинации с другими препаратами, включая ВНЗ-миметик Венетоклакс или цитостатики Цитарабин+Митоксантрон [12].

Сходной структурой с Флавопиридолом обладает Воруциклиб, который эффективно блокирует Mcl-1 в качестве монотерапии и усиливает Венетоклакс-индуцируемую клеточную гибель в модели *in vivo* диффузной В-крупноклеточной лимфомы. Сейчас целесообразность применения этой комбинации препаратов изучается на пациентах (NCT03547115) [12,151].

За последние годы были получены различные ингибиторы CDK, которые демонстрируют многообещающие результаты в доклинических исследованиях как в монотерапии, так и в комбинации с другими веществами (например, Венетоклаксом) и сейчас проходят клинические испытания. Среди них можно отметить Фадрациклиб (ингибитор CDK2/9) [152], AZD4573 (селективный ингибитор CDK9) [153], SY-1365 (селективный ингибитор CDK7) [154] и другие [155]. Особый интерес представляют высокоселективные соединения, поскольку специфичность их действия может позволить снизить риск развития побочных эффектов [12].

1.5.2. Непрямые ингибиторы Mcl-1 (трансляционный уровень)

Примером негативной регуляции Mcl-1 на трансляционном уровне является использование ингибиторов mammalian target of rapamycin (mTOR) [12]. Блокирование комплекса mTORC1 приводит к разрушению комплекса eIF4F и нарушению кэп-зависимого механизма трансляции, что выражается в снижении уровня Mcl-1 [156]. Было обнаружено, что соединения BEZ235 или AZD8055 эффективно подавляют синтез Mcl-1 и ведут к синергетическому эффекту в комбинации с Венетоклаксом в доклинических моделях тройного негативного рака молочной железы [157]. Кроме того, BEZ235 приводит к аналогичному эффекту в моделях ОМЛ [158]. BEZ235 был активно исследован в клинических испытаниях в течение последних лет как индивидуальный агент, так и в комбинации с другими соединениями. Однако во многих случаях были обнаружены выраженные токсические эффекты или была показана низкая эффективность предложенной терапии [159–162].

В качестве другого примера такой регуляции можно отметить использование Сорафениба, ингибитора киназ широкого спектра действия, известного также как Нексавар и разрешенного в клинической практике для лечения различных онкологических заболеваний. Было отмечено, что Сорафениб ингибирует трансляцию Mcl-1 в клетках лейкемии [163,164]. Кроме того, лечение Сорафенибом обеспечивало повышение эффективности других противораковых препаратов за счет подавления Mcl-1. Интересно, что Сорафениб показал свою эффективность в *in vitro* и *in vivo* моделях ОМЛ в сочетании с Третиноином, который в комбинации с химиотерапевтическими препаратами используется в качестве первой линии терапии у пациентов с острым промиелоцитарным лейкозом (ОПЛ). Третиноин подавляет транскрипцию гена Bcl-2, при этом приводя к кратковременному увеличению уровня Mcl-1 за счет активации трансляции и торможению его протеасомной деградации [165]. Таким образом, одновременное

подавление двух антиапоптотических белков (Bcl-2 и Mcl-1) демонстрирует перспективность совместного применения Третиноина и Сорафениба [12].

Наконец, было установлено, что Норкантаридин, проявляющий противоопухолевую активность в различных типах рака, способен повышать внутриклеточный уровень микроРНК-320d, негативного регулятора Mcl-1. Препарат показал свою эффективность в доклинических моделях рака простаты. Сейчас запущено клиническое испытание первой фазы по изучению свойств Норкантаридина на пациентах с солидными опухолями (NCT04673396) [166].

1.5.3. Непрямые ингибиторы Mcl-1 (посттрансляционный уровень)

Как уже было отмечено, Mcl-1 представляет собой короткоживущий белок, поэтому большую роль в его регуляции играют процессы убиквитин-зависимой протеасомной деградации. Препараты из группы сердечных гликозидов, часто используемые в лечении сердечно-сосудистых заболеваний, обладают противораковой активностью за счет снижения уровня Mcl-1 [12]. К примеру, Буфалин и Дигитоксин приводят к GSK3 β -опосредованной протеасомной деградации Mcl-1 в моделях немелкоклеточного рака легкого [167,168]. Более того, Буфалин преодолевает приобретенную устойчивость к разрешенному в клинической практике Осимертинибу (необратимый ингибитор протеинкиназ). Причиной устойчивости связана с повышением содержания Mcl-1, опосредованная белком репарации Ku70, выполняющего роль деубиквитиназы и, как следствие, препятствующего протеасомной деградации Mcl-1 [169].

Другим примером ингибирования Mcl-1 на посттрансляционном уровне является использование Ломегуатриба, представляющего собой ингибитор MGMT (O⁶-метилгуанин ДНК-метилтрансфераза). Данный фермент активирует на уровне транскрипции другую деубиквитиназу DUB3 (деубиквитинирующий фермент 3), которая, как и Ku70, препятствует протеасомной деградации Mcl-1, повышая его внутриклеточный уровень [170]. Использование подобных соединений может быть перспективным для селективного запуска апоптотической гибели в

злокачественных клетках с нарушенным балансом процессов убиквитирования/деубиквитирования [12].

Интересно, что таргетирование Mcl-1 может быть также значимо в терапии других заболеваний. Было установлено, что повышенный уровень Mcl-1 наблюдается в синовиальных фибробластах, участвующих в развитии ревматоидного артрита. Использование Урсоловой кислоты ведет к Noxa-зависимой протеасомной деградации Mcl-1 в указанных клетках, что может препятствовать прогрессированию ревматоидного артрита [171].

1.5.4. Создание прямых ингибиторов Mcl-1

Стоит отметить, что большинство представленных выше не прямых регуляторов Mcl-1 являются неселективными и проявляют противоопухолевую активность в результате воздействия на различные мишени, что может приводить к развитию нежелательных токсических эффектов и ограничивать спектр их возможного применения. Например, упомянутый ранее Флавопиридол приводит к выраженным расстройствам желудочно-кишечного тракта, которые, вероятно, обусловлены высоким сродством Флавопиридола не только к циклин-зависимым киназам, но и к другим ферментам, в частности, к креатинкиназе в клетках кишечника [12].

Для достижения специфичного действия в отношении Mcl-1 наиболее перспективной стратегией его нейтрализации считается использование высокоселективных низкомолекулярных антагонистов, относящихся к классу ВНЗ-миметиков. На данный момент несколько соединений изучаются во время клинических испытаний [12]. Создание антагонистов Mcl-1 было сопряжено с рядом проблем, представленных ниже (Рис. 6).



Рис. 6. Трудности на пути создания антагонистов Mcl-1. Пояснения приведены в тексте.

Mcl-1 как мишень. Как уже было упомянуто, Mcl-1 выполняет не только антиапоптотические функции, но и активно вовлечен в регуляцию различных физиологических процессов. Поэтому его ингибирование само по себе может быть токсичным.

Кроме того, структурные особенности данного белка осложняют разработку антагонистов, способных к взаимодействию с мишенью. Первоначально только крупные липофильные молекулы могли проникать в ВНЗ-связывающий карман Mcl-1. Однако их большой размер и липофильность не позволили получить эффективные препараты ввиду их неудовлетворительных фармакологических свойств. Более того, структура гидрофобного кармана Mcl-1 отличается конформационной жесткостью, что не свойственно другим антиапоптотическим белкам семейства Bcl-2 [172]. Появление новых методов дизайна лекарственных средств помогло создать низкомолекулярные соединения, характеризующиеся высокой аффинностью к Mcl-1. Примером такого метода является «SAR by NMR», суть которого заключается в подборе низкомолекулярных фрагментов, обладающих повышенным сродством к мишени, с их последующим соединением в единую структуру при помощи особых «линкеров» (связывающих групп) [12].

Крайне важно отметить, что существуют некоторые различия в аминокислотных последовательностях между мышинным и человеческим белком Mcl-1. В результате этого некоторые ингибиторы Mcl-1 имеют более низкое сродство к мышинному Mcl-1 по сравнению с его человеческим аналогом. Например, высокоэффективные и селективные ингибиторы Mcl-1, S63845 и AMG-176, характеризуются примерно в 6 и 1000 раз меньшим сродством к мышинному белку по сравнению с человеческим белком Mcl-1 соответственно. Эти различия в аффинности к Mcl-1 могут привести к недооценке возможной токсичности ингибиторов Mcl-1 в доклинических испытаниях. Для решения этой проблемы была получена гуманизированная мышинная модель: в мышей ввели ген человеческого Mcl-1. В настоящее время такая модель необходима для проведения доклинических испытаний новых ингибиторов Mcl-1 с целью корректного определения «терапевтического окна» - диапазона между эффективной и токсичной дозами препарата [12,173].

Важным препятствием на пути антагонистов Mcl-1 к клиническому применению является кардиотоксичность. Точный механизм этого эффекта пока не определен. Высказываются предположения, что она может быть обусловлена неапоптотическими функциями Mcl-1, следовательно, ингибиторы Mcl-1 могут подавлять эти функции белка в кардиомиоцитах, которые характеризуются высоким содержанием последнего. Специфическое ингибирование Mcl-1 в кардиомиоцитах мышей вело к дисфункции митохондрий, нарушению процессов аутофагии, гипертрофии и кардиомиопатии с нарушением структуры и организации саркомеров. Однако точные причины кардиотоксичности под действием ингибиторов Mcl-1 еще предстоит выяснить [15].

Стабильность молекул и неэффективное внутриклеточное проникновение. Как правило, существуют два основных типа одобренных к применению лекарственных соединений: макромолекулярные биологические препараты и низкомолекулярные агенты. Первые имеют большую площадь поверхности для

взаимодействия с мишенями, но не способны проходить через клеточные мембраны, что ограничивает возможность их применения. Альтернативным подходом является использование пептидов вместо целых белков, но они имеют низкую эффективность в *in vivo* моделях из-за их восприимчивости к протеолизу и недостаточному клеточному поглощению. Эти недостатки были преодолены с помощью создания синтетических модификаций, таких как «сшивание пептидов» (stappled peptides), что привело к повышению стабильности этих кандидатов в лекарственные средства. Класс «сшитых пептидов» содержит большое количество соединений, которые нарушают различные белок-белковые взаимодействия, в том числе между членами семейства Bcl-2. Впервые статья, посвященная «сшитым пептидам», была опубликована в 2000 году [12]. Bid стал первым белком, который был модифицирован путем «сшивания»: его «стабилизированная α -спираль ВНЗ-домена» (SANBA) успешно индуцировала апоптоз за счет связывания и активации Bax и ингибирования роста опухоли в *in vivo* модели лейкемии [174]. Позже, в 2010 году, был создан первый сшитый пептид, способный ингибировать Mcl-1. Обработка клеток SANBA из Mcl-1 приводила к активации внутреннего пути апоптоза Bак-зависимым образом [175]. В 2012 году был создан набор сшитых Noxa ВНЗ-пептидов с конъюгированным убиквитином. Конъюгированные пептиды показали более высокую активность и повышенную стабильность в мышинной сыворотке по сравнению с неконъюгированными пептидами [176,177]. Два года спустя были получены три Mcl-1-селективных пептида (MS), которые обладают более высоким сродством к целевому белку по сравнению с пептидами, полученными из Noxa. Дальнейшая оптимизация MS-1 способствовала созданию пептидов с улучшенными фармакологическими свойствами [178,179]. В 2018 году были представлены новые модификации MS-1 (SAN-MS1-14 и SAN-MS1-18), которые продемонстрировали улучшенное клеточное поглощение и селективно запускали апоптоз посредством разрушения комплексов Mcl-1/Bак в Mcl-1-зависимых клеточных линиях [180].

К настоящему моменту «сшитые пептиды», таргетирующие Mcl-1, еще не были изучены в клинических испытаниях. Тем не менее, эти результаты показали, что выделенный ВНЗ-пептид Mcl-1 представляет собой уникальный селективный ингибитор белка Mcl-1. Интересно, что низкомолекулярный ингибитор Mcl-1 MIM1 был выбран для дальнейшего изучения после скрининга «сшитых пептидов» [181]. Таким образом, эти данные подчеркивают значение концепции «сшитых пептидов» как экспериментальной модели для развития низкомолекулярных терапевтических агентов [12].

Низкая аффинность и неселективность. В ходе эволюции ингибиторов Mcl-1 значительно увеличилось их сродство к целевому белку и повысилась селективность. Первые соединения, способные блокировать Mcl-1, были малоэффективны и обычно демонстрировали низкую селективность [182]. Дальнейшая разработка ингибиторов Mcl-1 привела к появлению нового класса препаратов: пан-ингибиторов семейства Bcl-2, которые могли блокировать действие всех антиапоптотических белков. К ним относятся Обатоклакс и АТ-101. Они обладали повышенным сродством к Mcl-1, однако из-за широкого спектра взаимодействия с членами семейства Bcl-2 трудно оценить вклад подавления Mcl-1 в противоопухолевую активность этих соединений. Наконец, пан-ингибиторы семейства Bcl-2 имели различные побочные эффекты, связанные с взаимодействием с другими мишенями, что препятствует клиническому применению данных веществ [12].

Нецелевые эффекты, слабая эффективность в клинических испытаниях и низкая биодоступность. В качестве наглядного примера химического соединения, проявляющего целый спектр нецелевых эффектов, можно привести Обатоклакс. Этот пан-ингибитор Bcl-2 семейства продемонстрировал многообещающие результаты в доклинических исследованиях, проявляя выраженную противоопухолевую активность как индивидуальное соединение в различных *in vitro* и *in vivo* моделях [183,184]. В последующих работах было обнаружено, что

данный препарат ведет к длинному ряду нецелевых эффектов, включая аресты клеточного цикла, ингибирование аутофагии, стимуляция стресса ЭПР, нарушения работы лизосом и запуск некроптотической гибели [185–188]. Такой широкий спектр действия и низкая терапевтическая эффективность, показанная в ходе клинических испытаний, не позволили рассматривать этот препарат как перспективный ингибитор Mcl-1. Также не удалось пройти стадию клинических исследований другому неселективному препарату – АТ-101 [12]. Возможно, что одновременное блокирование всех антиапоптотических белков пан-ингибиторами ограничивает возможность использования таких доз, которые бы могли эффективно нейтрализовать отдельные антиапоптотические члены этого семейства. В этом контексте комбинации селективных ВНЗ-миметиков представляют собой более рациональный подход к терапии опухолей по сравнению с использованием пан-ингибиторов Bcl-2 семейства, поскольку разные концентрации различных соединений могут применяться для достижения эффективности, оставаясь в пределах «терапевтического окна» [12].

Было установлено, что вышеописанный ингибитор Mcl-1 MIM1 индуцирует Bак/Вах-опосредованный апоптоз в клетках лейкемии [181]. В то же время это соединение подавляло Mcl-1 посредством индукции экспрессии гена белка Noxa в ходе стресса ЭПР в клеточных линиях NB4, Jurkat и U937. Кроме того, MIM1 повышал чувствительность клеток NB4 к Венетоклаксу Noxa-зависимым образом. Похожий эффект был обнаружен и для ингибитора UMI-77 [189]. Тем не менее, повышение уровня Noxa, продемонстрированное для различных антагонистов Mcl-1, можно рассматривать в качестве частично целевого эффекта, поскольку этот белок избирательно ингибирует Mcl-1 и Bfl-1, но не другие члены семейства Bcl-2. Белок Noxa регулируется множеством стимулов, и его активация может быть использована для преодоления Mcl-1-зависимой устойчивости к апоптозу при терапии рака [190].

Селективный антагонист A1210477, используемый в рамках данной работы, показал высокую эффективность в доклинических исследованиях. В высоких дозах (свыше 10 мкМ) он способен разрушать комплексы Bax/Bim и запускать апоптотическую гибель по Bax/Bax-независимому пути. Также он способен приводить к DRP1-зависимой фрагментации митохондрий. Наконец, было выявлено, что A1210477 обладает неблагоприятными фармакологическими свойствами ввиду большого сродства к белкам сыворотки и, как следствие, низкой биодоступностью [12,189,191,192].

Другое соединение VU661013 представляет собой высокоаффинный ($K_i = 97 \pm 30$ пМ) и высокоселективный ингибитор Mcl-1, способный к эффективному замедлению роста клеточных линий ОМЛ, за исключением строго зависящих от Bcl-2. Венетоклакс усиливал его цитотоксичность в различных *in vitro* моделях ОМЛ. Помимо гематологических опухолей VU661013 показал свою эффективность в *in vitro* и *in vivo* моделях рака молочной железы. В 2018 году сообщалось о скором начале клинических испытаний с участием VU661013, однако по неизвестным общественности причинам до сих пор они не были запущены [12,15,193,194].

1.6. Перспективные ингибиторы Mcl-1 и рациональные комбинации с их участием

Несмотря на то, что все усилия по созданию ранее описанных соединений не принесли желаемого результата, их разработка не стала бесполезной: долгий и непростой путь разработки «идеальных» ингибиторов Mcl-1 привел к появлению нескольких высокоселективных и высокоаффинных антагонистов этого белка, которые сейчас проходят клинические испытания как в виде монотерапии, так и в сочетаниях с другими агентами. Приведенные ниже антагонисты Mcl-1 эффективно ингибируют целевой белок в нано- и пикомолярных концентрациях и запускают Bax/Bax-зависимый апоптоз в различных типах опухолей *in vitro* и *in vivo*.

S63845 и S64315/MIK665 (Servier и Vernalis, $K_i = 1,2$ нМ) [92]. Комбинация S63845 и Венетоклакса приводила к синергетическому эффекту в доклинических моделях ОМЛ [195]. Кроме того, подобный эффект наблюдается при использовании S63845 в сочетании с цитостатическим агентом Доцетакселом и с Трастузумабом (препарат на основе моноклонального антитела) или Лапатинибом (ингибитор тирозинкиназы) в доклинических моделях тройного негативного рака молочной железы и human epidermal growth factor receptor-2 (HER2)-позитивном раке молочной железы соответственно [196]. В 2023 году завершилась I фаза клинических исследований модифицированного производного S63845 (S64315/MIK665) в качестве комбинированной терапии с Венетоклаксом у пациентов с ОМЛ (NCT03672695) [12,15]. Однако результаты до сих пор не были обнародованы.

AZD5991 (AstraZeneca, $K_i = 0,2$ нМ) [197]. AZD5991 продемонстрировал многообещающие результаты в клеточных линиях колоректальной карциномы в сочетании с мультикиназным ингибитором Регорафенибом [198]. Были сообщения о наблюдаемом синергизме при сочетании AZD5991 с ингибитором протеасом Бортезомибом, химиотерапевтическими агентами Циклофосфамидом и Доксорубицином, ингибитором глутаминазы СВ-839 и другими. Безопасность и фармакологические свойства AZD5991 были исследованы на первой стадии (NCT03218683) клинических испытаний [12,15]. По решению организаторов они были остановлены. Возможно, это связано с ранее упомянутыми случаями кардиотоксичности.

AMG176 и AMG397 (Amgen, $K_i = 0,06$ нМ) [199]. Было выявлено, что применение AMG176 приводило к снижению количества многих типов клеток крови, включая В-клетки, моноциты, нейтрофилы, эозинофилы, базофилы и ретикулоциты, что можно использовать в качестве фармакодинамических «конечных точек» для оценки лечения. Были показаны синергетические эффекты при сочетании AMG176 с различными препаратами, в том числе с Венетоклаксом,

Карфилзомибом (ингибитор протеасом). Как и другие антагонисты Mcl-1, AMG176 проявлял большую активность в гематологических опухолях по сравнению с солидными типами рака. Это соединение было протестировано в клинических испытаниях как в виде монотерапии, так и в комбинации с Венетоклаксом и химиопрепаратом Азацитидином. Также был разработан другой антагонист – AMG397, первый ингибитор для перорального применения. Он также был исследован на первой стадии клинических испытаний. Сейчас они временно остановлены из-за выявленных случаев кардиотоксичности [12,15,200,201].

PRT1419 (Prelude Therapeutics). PRT1419 – это новый ингибитор Mcl-1, продукт природного происхождения, полученный из растения *Zygodunum pancheri*, произрастающего в лесах Новой Каледонии. Механизм действия аналогичен другим селективным ВНЗ-миметикам Mcl-1. Вызывает значительное уменьшение опухолевого роста в доклинических мышинных моделях ОМЛ и диффузной В-крупноклеточной лимфомы в качестве индивидуального агента, а также в комбинации с Венетоклаксом в модели ОМЛ. Было отмечено, что данное соединение не оказывало токсических эффектов на клетки крови и кардиомиоциты. PRT1419 в настоящее время проходит клинические исследования на пациентах с рецидивирующим/рефрактерным течением гематологических злокачественных новообразований, включая лимфоидные и миелоидные расстройства как в виде монотерапии (NCT04543305), так и в комбинации с Азацитидином или Венетоклаксом (NCT05107856). Также изучается при запущенных солидных опухолях, включая меланому, саркому, рак молочной железы и рак легкого (NCT04837677). Ввиду низкой токсичности дальнейшее изучение PRT1419 представляет особый интерес [15,202].

ABBV-467 (AbbVie). Антагонист ABBV-467 был изучен в первой стадии клинических испытаний в качестве индивидуального соединения на пациентах с ММ. В 2021 году исследование было остановлено по «стратегическим соображениям» (NCT04178902).

Стоит отметить, что маркером действия большинства прямых ингибиторов Mcl-1 является выраженное увеличение уровня целевого белка. Причина этого эффекта, скорее всего, связана с тем, что взаимодействие антагонистов и Mcl-1 приводит к стабилизации последнего за счет нарушения процессов убиквитинирования и активации процессов деубиквитинирования, что в результате выражается в блокировании протеасомной деградации. Так, например, использование ингибиторов Mcl-1 может приводить к подавлению взаимодействия с белком Noxa, регулирующего протеасомную деградацию Mcl-1 [12,15,203].

Несмотря на всю привлекательность Mcl-1 в качестве мишени противоопухолевой терапии, его подавление приводит к ряду проблем, описанных выше. Ввиду значимости Mcl-1 для поддержания нормального функционирования клеток его нейтрализация приводит к серьезным побочным эффектам, прежде всего к кардиотоксичности и нарушению гематопоеза [15,204]. Возможным путем их устранения является комбинирование ингибиторов Mcl-1 с другими противораковыми агентами, позволяющее снижать дозы препаратов и, следовательно, уменьшать побочные эффекты. Основные рациональные комбинации с участием антагонистов Mcl-1 приведены ниже. Можно также предположить, что такие подходы, как использование пролекарств и систем целевой доставки, в будущем могут помочь предотвратить развитие избыточной токсичности, связанной с блокированием Mcl-1.

Совместное использование Венетоклакса и антагонистов Mcl-1 является перспективной стратегией лечения онкологических заболеваний по ряду причин. Во-первых, опухолевые клетки часто приобретают устойчивость к действию традиционных химиотерапевтических средств, таких как Цисплатин, Доксорубицин и другим, за счет увеличения экспрессии генов антиапоптотических белков семейства Bcl-2 [53]. Во-вторых, выживаемость злокачественных клеток во многих случаях зависит не от одного антиапоптотического белка, а от нескольких, поэтому монотерапия будет малоэффективной тактикой лечения. В-третьих, для

опухолевых клеток характерен «компенсаторный» эффект: подавление одного антиапоптотического белка может привести к увеличению содержания одного или нескольких других представителей этой функциональной подгруппы с развитием приобретенной устойчивости к исходному препарату [7,12,15].

В качестве рациональных комбинаций могут быть рассмотрены сочетания антагонистов Mcl-1 и стандартных химиопрепаратов, например, ДНК-повреждающих агентов. Потенциальный механизм синергетического действия может заключаться в p53-зависимом повышении уровней проапоптотических белков Bax, Puma, которые будут усиливать апоптотическую гибель, вызванную подавлением Mcl-1 [15]. Аналогичный эффект может наблюдаться, если вместо химиотерапевтических агентов будут использованы антагонисты MDM2. В настоящем исследовании изучена целесообразность комбинирования S63845 и RG7388 (Идасанутлин) на модели нейробластомы, поскольку уже сейчас в клинике проходят испытания комбинации Венетоклакса и RG7388 (NCT04029688).

Также активно изучается совместное использование антагонистов Mcl-1 и ингибиторов протеасомной деградации (Бортезомиб, Карфилзомиб) (NCT02675452). Причина синергизма не ясна: возможно, это связано с повышением уровня Noxa, негативного регулятора Mcl-1, или Bim, BH3-only белка, под действием последних [7,15].

1.7. Предикторные маркеры чувствительности и устойчивости к антагонистам Mcl-1

Для наиболее эффективного применения BH3-миметиков Mcl-1 необходимо прогнозировать ответ злокачественных клеток различного происхождения при использовании данной группы препаратов. Как уже было отмечено, с этой целью активно изучается метод BH3-профайлинга [7]. С учетом механизма действия BH3-миметиков и профиля взаимодействия Mcl-1 с другими членами семейства Bcl-2 можно предположить, что высокий уровень Bax и низкий уровень Bcl-xL будут предикторными маркерами чувствительности опухолевых клеток к действию

антагонистов Mcl-1. Это подтверждается рядом работ [7,15], в том числе и результатами данного исследования, в то время как исходно высокий уровень Bcl-xL и/или других антиапоптотических белков будет препятствовать эффективному запуску апоптоза ВНЗ-миметиками Mcl-1 [7,12,15]. Интересно, что ответ на действие ингибиторов Mcl-1 не связан с уровнем целевого белка [92].

Предикторные факторы, определяющие низкую чувствительность опухолевых клеток к подавлению Mcl-1, могут иметь большое значение в контексте развития приобретенной устойчивости к антагонистам Mcl-1. Как уже было отмечено, возможен компенсаторный эффект, который выражается в увеличении в мутантных клетках экспрессии генов других антиапоптотических белков семейства Bcl-2 [15]. Ранее было обнаружено накопление Mcl-1 и Bcl-xL в Венетоклак-устойчивых опухолевых клетках [7]. Снижение проапоптотических факторов (Bax, Бах, Bim) тоже может вести к развитию приобретенной устойчивости к ингибированию Mcl-1 [7,15,205,206]. Интересно, что могут происходить изменения во внутриклеточных сигнальных путях, регулируемых киназами MEK и extracellular signal-regulated kinase (ERK) [7,15]. Было установлено, что опухолевые клетки с приобретенной устойчивостью обладали большей чувствительностью к MEK/ERK ингибиторам по сравнению с исходными клетками [15]. Стоит также учитывать возможное повышение уровня белков систем обратного выброса лекарств, например, белка multidrug resistance protein (MDR1), который также может быть одним из ключевых факторов множественной лекарственной устойчивости [15,207].

Отдельное внимание стоит уделить появлению мутаций в генах различных белков в случае развития приобретенной устойчивости к ВНЗ-миметикам. Во-первых, могут появиться изменения в структуре p53, что приведет к уменьшению активности этого белка и, как следствие, снижению экспрессии генов p53-зависимых проапоптотических белков (Bax, Puma, Noxa) [15]. Во-вторых, могут наблюдаться мутации в структурах порообразующих белков. К примеру, появление

замены Gly179Glu в белке Вах выразалось в нарушении транслокации данного белка из цитоплазмы к внешней мембране митохондрий, что препятствовало ПВММ и последующему запуску апоптоза по внутреннему пути [7,208]. В-третьих, могут произойти мутации непосредственно в генах целевых белков. Для белка Мсl-1 этот вопрос изучен слабо: на сегодня была показана роль мутации Leu267Val, приводящей к устойчивости злокачественных клеток к действию S63845 and AZD5991 [15]. В случае белка Всl-2 доказана значимость мутаций его гена в развитии устойчивости к Венетоклаксу [7]. Так, была выявлена клиническая значимость замены Gly101Val в белке Всl-2 на фоне приема Венетоклакса у пациентов с ХЛЛ. Данная мутация снижала сродство препарата к мишени примерно в 180 раз. Также была обнаружена мутация Asp103Glu. Примечательно, что именно наличие аспартата в этой позиции определяет избирательную селективность Венетоклакса к Всl-2 по сравнению с Всl-xL. Поэтому появление данной замены должно снизить эффективность взаимодействия лекарственного соединения с целевым белком [7,209–211]. В качестве возможного способа преодоления устойчивости к Венетоклаксу предлагается использовать другие, более эффективные антагонисты к Всl-2 [7].

Стоит отметить, что несмотря на имеющиеся данные по предикторным маркерам чувствительности и механизмам развития приобретенной устойчивости опухолевых клеток к ВНЗ-миметикам, эти вопросы требуют дальнейшего тщательного изучения, так как проблема резистентности к лекарственным препаратам, как правило, носит комплексный характер. Более того, она является важнейшим препятствием на пути достижения максимальной эффективности лечения при использовании одобренных препаратов и может стать «камнем преткновения» для агентов, проходящих клинические испытания. Поэтому изучение предикторов чувствительности и механизмов устойчивости к действию ингибиторов Мсl-1 стали одними из ключевых задач настоящего исследования.

1.8. Белок-белковые взаимодействия p53 и MDM2 как мишень противоопухолевой терапии

Как уже отмечалось, поиск рациональных комбинаций – одно из важнейших направлений в лечении онкологических заболеваний, поскольку сочетание разных препаратов может привести к усилению противоопухолевой эффективности при совместном использовании (синергетический эффект) и предотвратить развитие приобретенной устойчивости по сравнению с монотерапией. Комбинированная терапия при помощи Венетоклакса (ингибитора Bcl-2) и RG7388/Идасанутлина (ингибитора Mouse double minute 2 homolog (MDM2)) показала свою эффективность в доклинических моделях и сейчас изучается на пациентах с гематологическими и солидными опухолями (NCT04029688). Поэтому в рамках данной работы производилась оценка целесообразности ко-ингибирования Mcl-1 (S63845) и MDM2 (RG7388).

MDM2 является основным негативным регулятором белка p53, поддерживая его низкий внутриклеточный уровень в отсутствии стрессовых стимулов [212]. Известно, что активация p53 приводит, к повышению экспрессии генов различных проапоптотических факторов (в том числе Bax, Puma, Noxa) [13]. Поскольку ингибирование Mcl-1, ведет к высвобождению проапоптотических белков, то совместное использование антагонистов Mcl-1 и MDM2 может быть эффективной стратегией в борьбе с опухолевыми клетками. Ниже рассмотрены особенности функционирования белок-белкового взаимодействия p53 и MDM2 и способы его таргетирования.

1.8.1. Белок p53: строение и функции «стража генома»

Белок p53, кодируемый геном *TP53*, был открыт в 1979 году, и с той поры интерес к нему со стороны научного сообщества не ослабевает [213]. Этот белок является транскрипционным фактором, регулирующим экспрессию большого числа генов, и выполняет функции онкосупрессора, поддерживая сохранность генетического материала в нормальных и стрессовых условиях, препятствуя

процессу канцерогенеза. Такая функциональная активность обеспечила ему неофициальное название «стража генома» [214].

p53 состоит из 393 аминокислотных остатков (а. о.), которые составляют 5 доменов: N-концевой трансактивационный домен (1-42 а. о.), богатый пролином домен (63-97 а. о.), ДНК-связывающий домен (98-292 а. о.), тетрамеризационный домен (324-355 а. о.) и С-концевой регуляторной домен (363-393 а. о.). Первый отвечает за связывание с MDM2, второй и пятый выполняют структурно-регуляторные функции, третий – за взаимодействие с ДНК, четвертый – за образование тетрамеров белка p53 [1].

Активируясь и накапливаясь под действием различных стимулов (в первую очередь, при повреждении ДНК), белок p53 влияет на множество внутриклеточных сигнальных путей за счет транскрипционной активации широкого профиля генов, что приводит в том числе к изменениям клеточного цикла (G1/G2-аресты), процессов клеточного старения, дифференцировки стволовых клеток, метаболизма клеток (уменьшение интенсивности гликолиза), а также к повышению уровней апоптотических белков и запуску клеточной гибели, репарации ДНК и митофагии [214]. Было отмечено, что p53 может влиять тем или иным образом практически на все внутриклеточные компартменты [8].

Однако в злокачественных клетках часто происходит нарушение противоопухолевой активности p53 [13]. Во-первых, вследствие появления замен в последовательности белка: примерно в 40% случаев развития онкологических заболеваний наблюдаются значимые мутации гена *TP53* в опухолевых клетках. Их появление, как правило, приводит к неспособности взаимодействовать с ДНК или к нарушению стабильности белковой молекулы. Интересно, что мутантный белок p53 не только теряет онкосупрессорную активность, но и может становиться онкогеном, стимулируя процессы опухолевого перерождения. Опухоли с мутантным p53 становятся более злокачественными: ускоряется пролиферация клеток, повышается способность к метастазированию и их метаболическая

активность [8,13,215]. Во-вторых, может происходить амплификация гена *MDM2*, негативного регулятора p53 [13]. В-третьих, могут быть задействованы другие механизмы блокировки p53, например, усиление E6-зависимой протеасомной деградации p53 в клетках рака шейки матки, вызванном вирусом папилломы человека, или подавление за счет эпигенетической регуляции [13,216,217].

Таким образом, активация p53 или восстановление его онкосупрессорной активности являются привлекательными стратегиями терапии опухолей [8,13].

1.8.2. MDM2: строение и функции регулятора p53

Белок MDM2, кодируемый геном *MDM2* (человеческий гомолог иногда называют *HDM2*), является одним из основных регуляторов p53 [212]. MDM2 состоит из 491 а. о., соединенных в несколько доменов, которые отражают его функциональную активность. N-концевой домен необходим для связывания и подавления транскрипционной активности p53 (ключевые а.о. - Phe19, Trp23, Leu26). За ним следует связывающий (линкерный) домен, который отвечает за ядерную локализацию и ядерный экспорт. Центральный домен играет важную вспомогательную роль в деградации p53, домен цинкового пальца обеспечивает взаимодействие с различными белками, домен RING, расположенный на C-конце, важен для E3-лигазной активности [218,219].

Основным способом негативной регуляции p53 является его MDM2-зависимая протеасомная деградация за счет убиквитинлигазной активности (Рис. 7). Кроме того, MDM2 способствует экспорту p53 из ядра [220], препятствует его связыванию с ДНК [219], блокирует его на транскрипционном уровне (препятствует взаимодействию с активаторами транскрипции и облегчает связывание репрессоров транскрипции) [221,222]. Наконец, существует петля отрицательной обратной связи: повышение уровня p53 на транскрипционном уровне усиливает экспрессию *MDM2* [223].

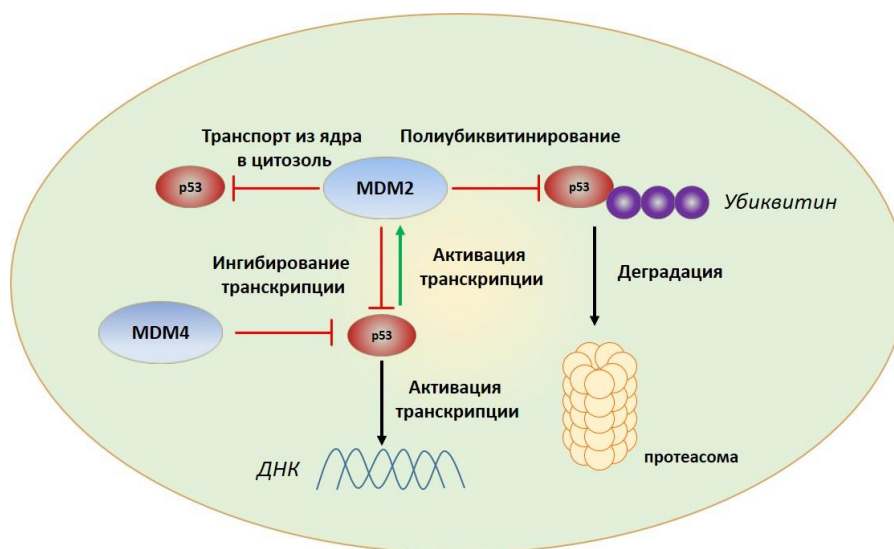


Рис. 7. Негативная регуляция p53 под действием MDM2 и MDM4.

Был обнаружен также другой блокатор p53 – Mouse double minute 4/X homolog (MDMX/MDM4), который имеет сходную с MDM2 доменную структуру, но не обладает лигазной активностью, поэтому усиливает MDM2-опосредованную деградацию p53 в протеасомах и непосредственно подавляет p53 благодаря негативной регуляции последнего на уровне транскрипции. Как и MDM2, ген MDMX может быть амплифицирован в некоторых типах рака, что способствует их прогрессированию [224].

MDM2, помимо регуляции p53, контролирует другие внутриклеточные процессы. Этот белок также стимулирует клеточную пролиферацию, VEGF-опосредованный ангиогенез, усиливает метастазирование, способен изменять метаболический профиль клеток и подавлять иммунный ответ [225,226]. Таким образом, с учетом ранее упомянутой амплификации гена в ряде опухолей, MDM2 обладает ярко выраженными онкогенными свойствами, являясь важной мишенью целевой терапии онкологических заболеваний.

1.9. Стратегии таргетирования p53 в зависимости от его статуса

Существуют два основных терапевтических подхода к восстановлению онкосупрессорной активности p53 в злокачественных клетках (Рис. 8). Первый заключается в ингибировании MDM2 для опухолей, содержащих белок p53 дикого

типа. Эти соединения блокируют прямое взаимодействие MDM2 и p53, что ведет к стабилизации и увеличению уровня последнего. При наличии замен в структуре p53 используется второй подход, который заключается в его «реактивации». Препараты-корректоры обеспечивают термодинамическую стабильность p53, придавая ему конформацию, подобную той, которой обладает исходный белок. Кроме того, существует ряд альтернативных стратегий по активации p53-зависимых сигнальных путей. К настоящему моменту множество соединений добрались до стадии клинических испытаний [8,13,214]. Ниже будут кратко представлены основные достижения в области таргетирования p53.

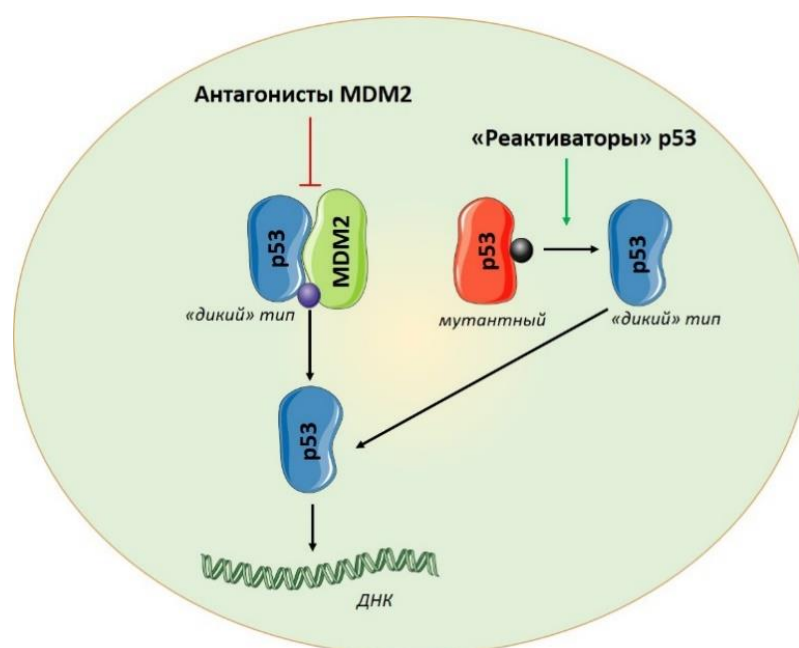


Рис. 8. Основные стратегии таргетирования p53 в зависимости от его статуса.

1.9.1. Ингибирование MDM2: активация p53 дикого типа в опухолевых клетках

Первыми антагонистами MDM2 стали нутлины, группа производных *цис*-имидазолинов, которая была открыта в 2004 году при помощи скрининга библиотеки синтезированных химических соединений. Наибольшим сродством к MDM2 среди первых нутлинов обладал Нутлин-3а (IC₅₀ = 88 нМ), который показал эффективную противоопухолевую активность в доклинических испытаниях *in vitro* и *in vivo* [227]. Анализ взаимодействия Нутлина-3а и MDM2 выявил, что связь

препарата и мишени реализуется за счет связывания первым трех а. о. – Phe19, Trp23, Leu26 [223]. Дальнейшая оптимизация структуры Нутлина-3а привела к созданию RG7112 (IC₅₀ = 18 нМ), который стал первым препаратом из этой группы, исследованным на пациентах [228]. RG7112 проявил высокую эффективность в различных доклинических *in vitro* и *in vivo* моделях [229], но результаты клинических испытаний оказались неудовлетворительными [230]. Для достижения терапевтического эффекта необходимо было использовать высокие дозы ингибитора, что сопровождалось развитием неблагоприятных побочных эффектов, таких как, желудочно-кишечные расстройства и подавление тромбопоэза. Так, у пациентов с липосаркомой наблюдались тромбоцитопения и нейтропения [8,13,228,231]. Это может быть связано с тем, что гематопоэтические прогениторные клетки и клетки ЖКТ проявляют высокую чувствительность к повышению внутриклеточного уровня p53, поскольку в нормальных условиях они характеризуются высоким уровнем экспрессии TP53, а дополнительная активация p53-зависимых сигнальных путей ведет к их гибели [228].

После RG7112 был разработан RG7388 (Идасанутлин), который обладал еще большим сродством к мишени по сравнению с предшественником (IC₅₀ = 6 нМ) [232]. Как и предыдущие соединения, он показывал многообещающие результаты в доклинических исследованиях, однако ему пока не удалось получить одобрение для использования в клинике. Многие испытания продолжаются по настоящий день, и их результаты еще не доступны, однако имеющиеся данные указывают на недостаточную терапевтическую эффективность и наличие токсических эффектов в ряде случаев [8,13]. В частности, анализ комбинации химиотерапевтического препарата Цитарабина и RG7388 по сравнению с Цитарабином и плацебо, проведенный на III фазе клинических испытаний, не выявил увеличения выживаемости у пациентов с рецидивирующим или рефрактерным ОМЛ [233]. В то же время RG7388 продемонстрировал обнадеживающие результаты при лечении пациентов с истинной полицитемией [234], однако наблюдаемые гематологические

и желудочно-кишечные токсические эффекты были частой причиной прекращения лечения [8,13].

В настоящее время также активно изучаются на пациентах с различными гематологическими и солидными опухолями и другие антагонисты MDM2, не относящиеся к семейству нутлинов. Все они обладают высоким и специфичным сродством к мишени, показали высокую эффективность в доклинических исследованиях и сейчас проходят клинические испытания как в монотерапии, так и в комбинации с другими противораковыми препаратами. Среди них можно выделить Миладаметан, APG-115 (Аризомадлин) и AMG232 (Навтемадлин). Оба обладают благоприятными фармакологическими свойствами и могут приниматься перорально. Наконец, стоит отметить разработку препарата ALRN-6924 (Суланемадлин) из класса «сшитых пептидов», упомянутого ранее в контексте таргетирования Mcl-1. Во-первых, он обладает двойным действием, ингибируя одновременно MDM2 и MDMX, что может увеличить его эффективность по сравнению с «классическими» селективными антагонистами MDM2. Во-вторых, он стал первым представителем класса «сшитых пептидов», попавшим на стадию клинических испытаний [8,13,223].

1.9.2. Активация мутантного p53 в опухолевых клетках

Как уже было отмечено, многие опухоли содержат мутантный белок p53, который не способен выполнять свои онкосупрессорные функции. Поэтому восстановление его функциональной активности является значимым направлением в противоопухолевой терапии. К настоящему моменту известно большое число молекул-«реактиваторов» мутантного p53 [8,13]. Важно отметить, что точный механизм действия для многих из них еще не до конца изучен. Ниже представлены наиболее интересные соединения, дошедшие до стадии клинических испытаний.

Активаторы p53 «широкого действия» - PRIMA-1 и APR-246 (Эпренетапопт)

В 2002 году было обнаружено соединение PRIMA-1, способное восстанавливать активность p53 в клетках остеосаркомы Saos-2,

трансфецированных плазмидой с мутантной формой p53 с заменой Arg273His, и подавлять рост опухоли в *in vivo* модели [235]. PRIMA-1 является пролекарством: в процессе его метаболизма образуется продукт MQ, который образует ковалентные связи с тиоловыми группами аминокислотных остатков цистеина в основном домене p53 с последующим восстановлением его конформации, идентичной белку p53 дикого типа. Кроме того, MQ может влиять на окислительно-восстановительный баланс внутри клеток благодаря взаимодействию с цистеиновыми остатками в молекуле глутатиона, тем самым ингибируя тиоридоксинредуктазу. Работа этого фермента, в свою очередь, крайне важна для роста и выживания клеток. Таким образом, это наглядный пример «положительного» нецелевого эффекта, наблюдаемого при использовании PRIMA-1 и усиливающего его противоопухолевую активность. Его производное APR-246 (Эпренетапопт) активно изучалось в клинических испытаниях, главным образом, в комбинации с ВНЗ-миметиком Венетоклаксом или с гипометилирующим химиотерапевтическим агентом Азацитидином на пациентах с солидными и гематологическими опухолями, показав в ряде исследований определенную эффективность. К недостаткам этих соединений можно отнести сложный и не до конца исследованный механизм действия, а также возможную токсичность, связанную с нарушением окислительно-восстановительного баланса в нормальных клетках [8,13,236–238].

Активаторы мутантного p53 с заменой Tyr220Cys – PC14856

Было обнаружено, что данная замена приводит к образованию в структуре основного домена p53 специфического кармана, с которым может взаимодействовать лекарственное соединение и обеспечивать возвращение нативной белковой конформации p53 [239]. Соединение PC14856, обладающее высокой пероральной биодоступностью, способно эффективно связываться с вышеуказанным гидрофобным карманом и восстанавливать функциональную активность p53. Данное соединение продемонстрировало обнадеживающие

результаты на начальном этапе клинических испытаний и в настоящее время продолжает активно изучаться. Однако корректоры замены Tug220Cys в p53 имеют существенный недостаток: эта мутация является довольно редкой (ее содержат около 1% солидных опухолей). Поэтому, благодаря высокой специфичности действия и предполагаемой высокой эффективности, эти препараты представляют собой наглядный пример стратегии персонализированной медицины, однако их применение будет ограничено [8,13].

Тиосемикарбазоны – корректоры мутантного p53 с заменой Arg175His

Мутация Arg175His в структуре p53 приводит к выраженным нарушениям исходной конформации ДНК-связывающего домена белка. В частности, наблюдается неправильное связывание ионов цинка, которое, в свою очередь, ведет к неправильному сворачиванию p53 (мисфолдинг белка) и его последующей инактивации. Было показано, что применение соединения COTI-2 вело к восстановлению исходной конформации p53 и запуску клеточной гибели опухолевых клеток. COTI-2 стал единственным препаратом этой группы, исследованным на пациентах с раком яичника, а также с раком головы и шеи. Недостатками тиосемикарбазонов являются нецелевые эффекты, которые не связаны с p53. Кроме того, их механизм малоизучен на настоящий момент [8,13].

Триоксид мышьяка

Триоксид мышьяка – препарат, одобренный Food and Drug Administration (FDA), для лечения острого промиелоцитарного лейкоза за счет запуска апоптоза и дифференцировки лейкемических промиелоцитов. Неожиданно было выявлено, что данный агент может действовать в качестве реактиватора p53: атом мышьяка может стабилизировать остатки цистеина в ДНК-связывающем домене p53, действуя подобно PRIMA-1. Многообещающие результаты в доклинических исследованиях позволили изучить эффективность триоксида мышьяка в новом качестве на онкологических пациентах, имеющих опухоли различного происхождения с мутантным p53. Таким образом, более детальное изучение

препаратов, ранее одобренных для одних заболеваний, может расширить сферу их применения. Тем не менее, токсические эффекты мышьяк-содержащих веществ могут стать препятствием для дальнейшего использования триоксида мышьяка [8,13,240].

1.9.3. Рациональные комбинации с участием ингибиторов MDM2

Важно отметить, что, несмотря на клиническую значимость ингибиторов MDM2, существуют «барьеры», препятствующие их одобрению. Основная проблема – это развитие побочных эффектов, связанных с повышением уровня p53, который присутствует во всех здоровых тканях организма. Некоторые типы клеток, прежде всего клетки крови и ЖКТ, проявляют высокую чувствительность к повышению уровня p53. Чтобы избежать этих негативных последствий, можно предложить два стратегических подхода, первый из которых – это целевая доставка противоопухолевых агентов. Ее примером является препарат SGT-53, комплекс, состоящий из плазмиды с геном, несущим белок p53 дикого типа, инкапсулированный в липосому, которая на своей поверхности содержит антитело против рецептора трансферрина для обеспечения селективной доставки (опухолевые клетки характеризуются повышенной потребностью в железе из-за повышения уровня метаболизма, перенос которого осуществляется белком трансферрином) [8]. Сейчас SGT-53 в комбинации с Гемцитабином и Амбраксаном тестируется на II стадии клинических испытаний (NCT02340117). Другим примером целевой доставки является использование мРНК-вакцин, содержащих последовательность p53 дикого типа. Так, p53mva в сочетании с Пембролизумабом (ингибитором PD-1), также находится на II стадии клинических испытаний (NCT03113487). Оба исследования еще не завершены (находятся в активной стадии или в процессе подбора пациентов), поэтому их результаты пока еще не доступны.

Вторым подходом является одновременное применение нескольких лекарственных препаратов. Комбинированная терапия опухолей позволяет снизить дозы выбранных соединений, и, следовательно, степень выраженности

токсических эффектов. Кроме того, это может предотвратить развитие приобретенной лекарственной устойчивости, одинаково свойственной как стандартным химиопрепаратам, так и агентам целевого действия. На сегодняшний момент известно большое число различных сочетаний между антагонистами MDM2/реактиваторами p53 и препаратами из других классов, которые продемонстрировали свою эффективность в доклинических моделях. Наиболее успешные сочетания были исследованы или продолжают изучаться на стадии клинических испытаний [241]. Ниже рассмотрены некоторые наиболее интересные комбинации противоопухолевых агентов с участием антагонистов MDM2 (Табл. 1).

Таблица 1. Сочетания антагонистов MDM2 и других противораковых препаратов.

Группа препаратов	Антагонист MDM2	Комбинация	Показания	Состояние	Ссылка
Антиметаболиты	APG-115 (Аризомадлин)	Азацитин	рецидивирующий или рефрактерный ОМЛ, хронический миеломоноцитарный лейкоз (ХММЛ), миелодиспластический синдром	I/II фаза (подбор пациентов)	NCT04358393
	AMG232 (Навтемадлин)	Цитарабин, Децитабин	ОМЛ	I/II фаза (идет)	NCT04113616
Ингибитор микротрубочек	ALRN-6924 (Суланемадлин)	Паклитаксел	Солидные опухоли	I фаза (идет)	NCT03725436
ВНЗ-миметики	RG7388 (Идасанутлин)	Венетоклакс	Острые лейкозы, солидные опухоли	I/II фаза (подбор пациентов)	NCT04029688
Ингибиторы тирозинкиназ	AMG232 (Навтемадлин)	Руксолитиниб	Истинная полицитемия	II фаза (завершено)	NCT03669965
Ингибитор MEK	AMG232 (Навтемадлин)	Траметиниб	рецидивирующий или рефрактерный ОМЛ	I фаза (завершено)	NCT02016729
Ингибитор протеасомной деградации	AMG232 (Навтемадлин)	Карфилзомиб	Множественная миелома	I фаза (подбор пациентов)	NCT03031730
Препараты моноклональных антител	APG-115 (Аризомадлин)	Торипалимаб	Липсаркома и другие солидные опухоли	I/II фаза (подбор пациентов)	NCT04785196
	Идасанутлин	Ритуксимаб	Диффузная В-крупноклеточная лимфома	I фаза (завершено)	NCT02624986

Стоит отметить, что предпринимаются попытки сочетать антагонисты MDM2 с классическими химиопрепаратами-цитостатиками, влияющими на процессы деления и гибели клеток – Цисплатином, Доксорубицином, Азацитидином, Цитарабином и другими. Потенциальный механизм синергетического действия заключается в том, что повреждение ДНК само по себе ведет к запуску сигнальных каскадов, ведущих к накоплению p53, а добавление

ингибиторов MDM2 способствует его более продолжительной активации и стабилизации за счет блокирования негативного регулятора [241].

Весьма многообещающей может быть комбинация ингибиторов антиапоптотических белков семейства Bcl-2 и антагонистов MDM2. Рациональность данного сочетания обуславливается увеличением внутриклеточных уровней проапоптотических факторов. С одной стороны, активация p53 ведет к повышению уровней эффекторного белка Bax и BHL-1 only белков Puma, Noxa [242]. С другой стороны, при добавлении BHL-1 миметиков происходит разрушение комплексов между анти- и проапоптотическими белками, что приводит к высвобождению последних. Более того, повышенный уровень антиапоптотических белков может препятствовать p53-опосредованному запуску гибели клеток [67].

Кроме того, исследуется целесообразность комбинирования антагонистов MDM2 и противоопухолевых агентов различного действия. К примеру, были проведены клинические испытания по совместному применению антагониста MDM2 AMG232 с ингибитором MEK Траметинибом на пациентах с ОМЛ (NCT02016729). Данное сочетание показало определенную эффективность при лечении ОМЛ, однако были выявлены выраженные желудочно-кишечные расстройства [243]. Также исследуются комбинации антагонистов MDM2 и препаратов из группы моноклональных антител. Ранее было исследовано сочетание блокатора CD20 (cluster of differentiation 20), Ритуксимаба, и RG7388 на пациентах с диффузной В-крупноклеточной лимфомой (NCT02624986). После проведения первой фазы они были прекращены по решению организаторов. Возможно, это решение связано с недостаточной эффективностью лечения или выявленными токсическими эффектами.

1.9.4. Устойчивость опухолевых клеток к ингибированию MDM2

Развитие приобретенной лекарственной устойчивости является одной из важнейших проблем современной медицины. К сожалению, этот эффект

наблюдается при использовании многих противоопухолевых соединений, как в случае химиотерапевтических агентов (цитостатиков), так и для препаратов целевого действия. Было обнаружено, что в результате применения антагонистов MDM2 также могла развиваться резистентность к ним в опухолевых клетках [16]. Одной из основных причин ее появления является возникновение аминокислотных замен в структуре p53, которые приводили или к нарушению связывания ДНК, или к термодинамической нестабильности белка [244]. Также отмечалось, что в устойчивых к ингибированию MDM2 мутантных клетках происходили изменения в сигнальных каскадах (например, Mitogen-activated protein kinase (MAPK)/ERK), что приводило к увеличению их пролиферативной и инвазивной активности [245]. Кроме того, в модели немелкоклеточного рака легкого отмечалось повышение уровня факторов, отвечающих за эпителиально-мезенхимальный переход и за увеличение содержания провоспалительных цитокинов [246]. Следует отметить, что появление устойчивости к действию антагонистов MDM2 может сопровождаться пониженной чувствительностью к классическим химиотерапевтическим препаратам, поскольку, как было упомянуто, механизм действия некоторых из них, например, ДНК-повреждающих агентов, также связан с активацией p53. Таким образом, возможное нарушение функциональной активности TP53 вследствие появления мутаций в его структуре будет также негативно влиять на противоопухолевую активность таких соединений [16,241].

Сейчас данная проблема находится в активной стадии изучения, поэтому получение и накопление новых данных о потенциальных механизмах развития устойчивости к ингибированию MDM2 представляется крайне важной задачей, так как соединения данной группы активно изучаются в клинических испытаниях.

Таким образом, таргетное подавление белков Mcl-1 и MDM2 за счет селективных антагонистов в случае успешного завершения клинических испытаний может повысить эффективность существующих стратегий терапии рака. Однако нужно учитывать все возможные риски, связанные с использованием

этих препаратов, в особенности — избегать чрезмерной токсичности и препятствовать развитию приобретенной устойчивости, что может достигаться рациональными сочетаниями исследуемых ингибиторов с другими противораковыми агентами.

При написании обзора литературы были использованы материалы статей автора диссертации [7,12,74].

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Материалы

2.1.1. Буферные и рабочие растворы

Буфер PBS (Phosphate Buffered Saline): 5,2 мМ Na_2HPO_4 , 1,7 мМ KH_2PO_4 , 150 мМ NaCl

TBS (Tris-Buffered Saline) (150 мМ NaCl , 20 мМ Трис- HCl , $\text{pH} = 7,4$)

TBST (раствор TBS с добавлением 0,1% Tween-20)

Буфер для разведения первичных антител (2,5% BSA (Amresco), 0,02% NaN_3 в растворе TBST)

RIPA-буфер (25 мМ Трис- HCl ($\text{pH} = 7,4$), 1мМ ЭДТА, 150 мМ NaCl , 0,1% SDS, 0,5% дезоксихолата натрия, 1% Triton X-100, коктейль ингибиторов протеаз cOmplete (Roche))

5X Лэмбли буфер (250 мМ Трис- HCl ($\text{pH} = 6,8$), 50% глицерина, 10% SDS, 5% β -меркаптоэтанола, 0,01% бромфенолового синего)

Раствор Ponceau S (0,1 % Ponceau S (Sigma), 5% ледяной уксусной кислоты)

Раствор 12%-ного полиакриламидного геля (ПААГ) в расчете на 5 мл (1 гель) состоит из 1,4 мл воды, 1,25 мл Трис- HCl (1,5 М, $\text{pH} = 8,8$), 1,4 мл 40%-ного раствора акриламида (Bio-Rad), 0,8 мл 2%-ного раствора бисакриламида (Bio-Rad) и 50 мкл 10%-ного раствора SDS. Затем добавляли 30 мкл 10%-ного раствора персульфата аммония и 3 мкл TEMED для полимеризации геля указанного объема.

Раствор 4%-ного ПААГ в расчете на 2,5 мл (1 гель) состоит из 1,78 мл воды, 210 мкл Трис- HCl (500 мМ, $\text{pH} = 6,8$), 240 мкл 40%-ного раствора акриламида (Bio-Rad), 130 мкл 2%-ного раствора бисакриламида (Bio-Rad) и 25 мкл 10%-ного раствора SDS. Затем добавляли 15 мкл 10%-ного раствора персульфата аммония и 2,5 мкл TEMED для полимеризации геля указанного объема.

10X буфер для электрофореза (250 мМ основания Трис, 1,92 мМ глицина, 0,1% SDS)

1X буфер для электрофореза (смешивание 1 части 10X буфера для электрофореза и 9 частей воды)

10X буфер для переноса (250 мМ основания Трис, 1,92 М глицина)

1X буфер для переноса (смешивание 1 части 10X буфера для переноса, 2 частей 95%-ного этанола и 7 частей воды)

Раствор Версена (стерильный – ПанЭко, Россия)

Раствор DPBS (натрий-фосфатный буфер, модификация Дульбекко, стерильный – ПанЭко, Россия)

2.1.2. Реактивы

В ходе выполнения экспериментов были использованы следующие химические реагенты: BSA (bovine serum albumin), EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid), SDS (sodium dodecyl sulfate), Персульфат аммония (все – Amresco); DMSO (Dimethyl sulfoxide), Обезжиренное молоко, Параформальдегид (все – Sigma-Aldrich); DTT (dithiothreitol) от (Thermo Fisher Scientific); NaCl, HCl, NaN₃, Triton X-100, ТЕМЕД, Na₂HPO₄, KH₂PO₄, дезоксихолат натрия, Tween-20 (polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate), Глицерин, Глицин, Трис, Этанол 95%, β-меркаптоэтанол, бромфеноловый синий (все – Helicon); Акриламид 40%, Метилен-бис-акриламид (N N') 2%, Precision Plus Protein Dual Color Standards 161-0374 (маркер белковой массы) (все – Bio-Rad).

Коммерческие реагенты, реактивы для отдельных методик и используемое оборудование указаны в соответствующих разделах главы «Материалы и Методы» с указанием фирмы-производителя (в случае оборудования - модели).

2.1.3. Антитела

В экспериментах были использованы первичные антитела к следующим белкам: PARP (Abcam, ab74290), PARP cleaved (Cell Signaling, #5625), Bcl-2 (Santa Cruz, sc-7382), Bcl-xL (Cell Signaling, #2764), Mcl-1 (Cell Signaling, #5453), Bak (Cell Signaling, #6947), Bax (Cell Signaling, #2772), Bim (Cell Signaling, #2933), caspase-3 cleaved (p19/17) (Cell Signaling, #9661), caspase-3 (Cell Signaling, #9662), p53 (Sigma-Aldrich, P6874-200UL), p21 Waf1/Cip1 (Cell Signaling, #2946), Bid (Cell Signaling, #2002), MDM2 (Cell Signaling, #86934), Puma (Cell Signaling, #4976), tubulin (Abcam, ab4074), GAPDH (Cell Signaling, #2118), vinculin (Abcam, ab123002).

В качестве вторичных антител применяли антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена, к мышинному или кроличьему IgG (Abcam, ab97046 или Jackson ImmunoResearch 515-035-062 и ab97200 или Jackson ImmunoResearch 111-035-144 соответственно). Разведения антител были выбраны в соответствии с рекомендациями производителя.

2.1.4. Клеточные культуры

Исследования были проведены на клеточных линиях нейробластомы (SH-SY5Y, SK-N-SH и SK-N-Be(2)c), аденокарциномы шейки матки (HeLa), аденокарциномы легкого (H23, U1810 и A549), аденокарциномы яичника (Caov-4), колоректального рака (RKO и HCT116). Все линии клеток были предоставлены Отделением токсикологии Каролинского института (Стокгольм, Швеция) и постоянно контролировались на отсутствие микоплазмы.

2.1.5. Обработка клеток

При работе с клеточными культурами использовали следующие химические соединения: Цисплатин (Cisplatin – TEVA), Доксорубицин (Doxorubicin) и Нутлин-3а (Nutlin-3a) (Sigma-Aldrich), A1210477 и S63845 (Active Biochem), АВТ-199 (Венетоклак – Venetoclax), A1331852 и RG7112 (все – Selleckchem), RG7388 (Идасанутлин – Idasanutlin) (Roche). Новые антагонисты MDM2, производные

Нутлина-За, были получены Базановым Д.Р., к.х.н., м.н.с. химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

Во всех экспериментах к контрольным клеткам добавляли соответствующий растворитель, который не содержал указанные соединения.

2.1.6. Снижение уровня белка за счет РНК-интерференции

Для проведения процедуры РНК-интерференции были приготовлены растворы малых интерферирующих РНК (миРНК) по следующим схемам:

А) миРНК к Mcl-1 - олигонуклеотиды растворяли в воде, свободной от РНКаз (концентрация 125 мкМ). Затем равные объемы смысловой и антисмысловой цепей смешивали и добавляли буфер для отжига (буфер О, СибЭнзим) в соотношении 1 часть буфера на 4 части смеси олигонуклеотидов. После чего данную смесь делили на порции по 50 мкл (для равномерного прогревания) и нагревали до 90°C, а затем медленно охлаждали на водяной бане. В полученном растворе концентрация миРНК составляла 50 мкМ. Последовательности цепей для Mcl-1: антисмысловая – 5'TCTGCTAATGGTTCGATGCdTdT-3', смысловая – 5'-GCATCGAACCATTAGCAGAdTdT-3'.

Б) миРНК к Vak, Vax, Vim - смесь олигонуклеотидов растворяли в приготовленном заранее буфере для разведения (9 частей воды, свободной от РНКаз, и 1 часть буфера для отжига (буфер О, СибЭнзим)) в количестве 10x μl буфера на x нмоль нуклеотидов (финальная концентрация – 100 мкМ). Далее смесь делили на порции по 50 мкл (для равномерного прогревания), нагревали до 90°C, затем медленно охлаждали на водяной бане. Последовательности цепей: #1 Vak – GuAcGAAGAuucuuuAAAuTsT; AUUUGAAGAAUCUUCGuACTsT; #7 Vak – AAGcGAAGucuuuGccuucTsT; GAAGGcAAAGACUUCGCUUTsT; #1 Vax – uuuucuGAcGGcAAcuucATsT; UGAAGUUGCCGUcAGAAAATsT; #5 Vax – AAcuGAucAGAAccAucAuTsT; AUGAUGGUUCUGAUcAGUUTsT; #8 Vim – AccGAGAAGGuAGAcAAuuTsT; AAUUGUCuACCUUCUCGGUTsT; #9 Vim –

GuGAccGAGAAGGuAGAcAAuuGcAGcTsT;
GCUGcAAUUGUCuACCUUCUCGGUcACTsT.

Дизайн и синтез миРНК проводила лаборатория химии нуклеиновых кислот химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова (Руководитель - проф., к.х.н. Зацепин Т.С.).

2.2. Методы

2.2.1. Культивирование клеток

Клетки выращивали в CO₂-инкубаторе (5% CO₂ и 37°C) в среде DMEM (Gibco), содержащей 1 mM пирувата натрия (ПанЭко), 10% телячьей сыворотки (Gibco), смесь антибиотика пенициллина (100 ЕД/мл) и антимикотика стрептомицина (100 мкг/мл) (Gibco). Для экспериментов использовали клетки в логарифмической фазе роста. Для пересадки клеток их отделение от культурального пластика осуществляли с помощью 0,2% раствора трипсина (Gibco) после промывки раствором Версена (ПанЭко). Заморозка клеток происходила на 3-4 пассаже в присутствии культуральной среды, содержащей 5% диметилсульфоксида (Gibco). Количество клеток подсчитывалось при помощи счетчика Beckman Z2 Coulter counter.

2.2.2. Экспериментальные процедуры

В ходе экспериментов использовали клетки с конfluентностью 70-80%, в которых кондиционированную среду удаляли и добавляли к ним свежую среду, а также необходимые реагенты в рабочих концентрациях и тщательно перемешивали. К контрольным клеткам добавляли соответствующий используемому реагенту растворитель.

2.2.3. Трансфекция клеток

Перед трансфекцией клетки промывали раствором PBS. После этого к ним добавляли приготовленную трансфецирующую смесь с учетом объема чашки (1 мл – чашка диаметром 35 мм или 2 мл – чашка диаметром 60 мм). Смесь для

трансфекции готовили путем смешивания в пробирке среды для трансфекции Opti-MEM (Gibco), трансфецирующего агента в количестве 3 мкл на 1 мл среды и миРНК в количестве, необходимом для достижения итоговой концентрации. Перед добавлением к клеткам трансфецирующую смесь выдерживали в течение 5-10 минут для липосомирования РНК. В качестве трансфецирующего агента использовали Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen). Рабочая концентрация для миРНК к Mcl-1 – 100 нМ, для миРНК к Vak, Vax и Vim – 50 нМ. Время инкубации составляло 24 часа для миРНК к Mcl-1, Vak, Vax и Vim.

2.2.4. Вестерн-блот анализ

После окончания культивации клеток в условиях, описанных в эксперименте, их отделяли скребком от поверхностей чашек Петри. После этого клетки центрифугировали (800-1200 gcf в течение 5 мин при температуре +4°C) и промывали холодным раствором PBS (ПанЭко) с последующим центрифугированием. Полученный осадок клеток в зависимости от его объема ресуспендировали в 30-80 мкл RIPA-буфера и инкубировали на льду в течение 15-25 минут. После центрифугирования (16000 gcf, 20 мин, +4°C) отбирали супернатант и готовили образцы для Вестерн-блот анализа путем смешивания клеточного лизата (20-30 мкг белка) с 4-6 мкл 5X Лэммли буфера и водой для получения проб объемом 20-30 мкл. Предварительно часть супернатанта отбирали для последующего измерения концентрации белка в лизатах клеток набором Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific). Полученные пробы прогревали при +95°C в течение 4-6 мин.

Затем образцы разделяли в полиакриламидном геле (4% – концентрирующий, 12% – разделяющий; 1X электродный буфер использовался для проведения геле-электрофореза) или TGX геле (Bio-Rad) и переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Bio-Rad) при помощи камер для переноса Mini Trans-Blot (Bio-Rad) и соответствующего 1X буфера. Дальнейшие манипуляции осуществляли при постоянном перемешивании на качающемся шейкере (ELMI S-4). Качество

переноса определяли при помощи реагента Ponceau S (помещали в раствор на 1-2 минуты, после чего отмывали в течение 5-7 минут в растворе TBS). Мембраны блокировали в течение 35-50 минут в 5% растворе обезжиренного молока, разведенного в TBS. Затем мембрану промывали пять раз (по 4-5 минут каждый) в растворе TBS и инкубировали в течение 14-22 часов при температуре +4°C с первичными антителами, разведенными в соответствующем буфере. После четырех промывок (по 5 минут каждая) в TBS к мембране добавляли вторичные антитела, разведенные в 2,5% растворе обезжиренного молока, и инкубировали в течение 1-2 часов. После пятикратной отмывки (каждая по 5 минут) от вторичных антител в растворе TBST мембраны проявляли при помощи реагента ECL (Promega) на приборе Molecular Imager ChemiDoc (Bio-Rad). Уровень белков определялся при помощи денситометрического анализа. Для их нормализации использовали белки загрузки (tubulin, vinculin, GAPDH).

2.2.5. Проточная цитофлуориметрия

А. Цитофлуориметрический анализ с окраской Аннексином V-FITC и йодидом пропидия. Клетки отделяли от поверхности чашек Петри при помощи 0,2% раствора трипсина. После этого их центрифугировали (800-1200 rcf, 5 мин, +4°C), промывали холодным раствором PBS (ПанЭко) и проводили повторное центрифугирование. Далее осадок ресуспендировали в PBS (500 мкл/1 млн. клеток) и около 100-150 тыс. клеток переносили в 200 мкл 1x аннексин-связывающего буфера (BD Biosciences). Затем добавляли аннексин V-FITC (Invitrogen) в количестве 2 мкл и инкубировали в темном месте при комнатной температуре (10 мин). После этого к пробам добавляли йодид пропидия до конечной концентрации 0,5 мкг/мл и после пятиминутной инкубации анализировали популяции клеток с использованием проточного цитофлуориметра BD FACSCanto II (BD Biosciences) и программного обеспечения BD FACSDiva (BD Biosciences).

Б. Цитофлуориметрический анализ методом subG1. Пробоподготовка клеток производилась аналогичным образом, как и в случае окрашивания Аннексином V-

FITC и йодидом пропидия (A). Далее к клеточному осадку добавляли 70% ледяной спирт в растворе PBS для фиксации клеток при -20°C в течение 24 часов. Затем удаляли спирт, а клетки ресуспендировали в растворе PBS, добавляли йодид пропидия (50 мкг/мл) и РНКазу А (100 мкг/мл) и инкубировали в темном месте при комнатной температуре в течение 10 мин и анализировали так же, как и при окраске Аннексином V-FITC и йодидом пропидия (A).

Для каждого из двух типов проточной цитофлуориметрии в ходе экспериментов в каждом образце анализировалось 10 тысяч клеток. Обработка полученных данных обеспечивалась при помощи программного обеспечения FlowJo (FlowJo LLC).

2.2.6. ПЦР в реальном времени

Для выделения суммарной РНК из клеток среду из чашек удаляли и добавляли реагент Trizol (Invitrogen) в количестве 700 мкл на чашку 60 мм, клетки ресуспендировали и инкубировали в течение 10-15 минут при комнатной температуре. Затем добавляли 140 мкл хлороформа (Sigma-Aldrich), перемешивали и инкубировали 5 минут на льду. Полученную смесь центрифугировали (16000 gcf, 15 мин, 4°C). Аккуратно отбирали образовавшийся в результате разделения фракций верхний слой, содержащий РНК, смешивали с 350 мкл изопропанола и инкубировали в течение 20 минут (-80°C). После чего смесь центрифугировали (16000 gcf, 15 мин, 4°C). Супернатант удаляли, к осадку добавляли 500 мкл 75% этанола и ресуспендировали. Смесь вновь подвергали центрифугированию (16000 gcf, 15 мин, 4°C), удаляли супернатант и высушивали осадок в течение 5 минут на воздухе. Затем растворяли его в небольшом (20-30 мкл) объеме воды, свободной от РНКаз.

Концентрацию РНК в полученном растворе измеряли с помощью прибора NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). Далее отбирали объем, содержащий 1 мкг РНК, затем добавляли к нему 3 мкл 20 мкМ раствора праймеров Random(dN)₁₀ и Oligo(dT)₁₅ (Евроген) и деионизированную воду до объема 10 мкл. Смесь

перемешивали и инкубировали при +70°C в течение 5 минут, а затем охлаждали до 4°C в амплификаторе. Параллельно готовили смесь для обратной транскрипции, которая содержит в расчете на одну пробу 4 мкл буфера First Strand (Invitrogen), 0,5 мкл ингибитора РНКаз Ribolock (Fermentas), 0,5 мкл буфера MMLV RT 5x (Fermentas), 2 мкл DTT, 2 мкл смеси дезоксирибонуклеотидов (с исходной концентрацией 10 мМ каждого, Евроген) и 1 мкл воды, свободной от РНКаз. Данную смесь добавляли к раствору общей мРНК с отоженной на ней смесью праймеров Random(dN)₁₀ и Oligo(dT)₁₅. Полученную многокомпонентную систему инкубировали в амплификаторе при +42°C в течение 1 часа, далее нагревали на 10 минут до +70°C для последующей инактивации обратной транскриптазы.

В результате получался раствор, содержащий кДНК, синтезированную на матрице общей мРНК, который разводили до 200 мкл. В каждую лунку планшета для проведения ПЦР в реальном времени (Sorenson Bioscience) вносили 10 мкл раствора кДНК, 4 мкл смеси qPCRmix-HS SYBR (Евроген), 0,8 мкл смеси прямого и обратного праймеров и 5,2 мкл деионизированной воды. Планшет заклеивали пленкой для проведения ПЦР в реальном времени (UltraFlux, SSIbio), центрифугировали (300 gcf, 5 мин, комнатная температура) и помещали в детектирующий амплификатор CFX96 (Bio-Rad).

Значение концентрации мРНК p21, MDM2, Вах, Puma, Bcl-2, Bcl-xL вычисляли по отношению к мРНК транскрипционного фактора ТАТА-связывающего белка. Для амплификации MDM2 использовали праймеры: GCAGTGAATCTACAGGGACG (прямой) и TCCTGATCCAACCAATCACCT (обратный), для p21 – TGGAGACTCTCAGGGTCGAAA (прямой) и GGCGTTTGGAGTGGTAGAAATC (обратный), для ВАХ - GTCGCCSTTTTCTACTTTGC (прямой) и CGGAGGAAGTCCAATGTCC (обратный), для Puma – CCTCAACGCACAGTACGAG (прямой) и GCACСТААТТGGGСТССАТС, для Bcl-2 – GGATGACTGAGTACCTGAACC (прямой) и CAGCCAGGAGAAATCAAACAG (обратный), для Bcl-xL –

CTGTGCGTGGAAAGCGTAG (прямой) и ATGGTCAGTGTCTGGTCAATTC (обратный); для амплификации ТАТА-связывающего белка – GAGAGTTCTGGGATTGTACC (прямой) и GGATTATATTCGGCGTTTCG (обратный). Расчеты производили с учетом эффективности амплификации, которую определяли при помощи построения калибровочной прямой.

2.2.7. Оценка метаболизма клеток

Для оценки клеточного метаболизма использовали 96-луночный планшет (5 тыс. клеток на лунку). Спустя 24 часа инкубации в среде клетки промывали раствором PBS, после чего инкубировали в среде для анализа в течение 3 часов в инкубаторе без углекислого газа. Среда для анализа представляла собой среду DMEM с добавлением 2 мМ глутамина (Gibco) без телячьей сыворотки, фенолового красного, глюкозы и пирувата натрия для оценки гликолиза. Для оценки дыхания использовали ту же среду с добавлением 1 мМ натрия пирувата и 10 мМ глюкозы. Скорость потребления кислорода и скорость внеклеточного закисления оценивали при помощи Seahorse XF (Agilent). Во время оценки дыхания в лунки добавляли 1 мкМ олигомицина (подавление АТФ-синтазы), 1 мкМ карбонилцианид-м-хлорфенилгидразона (СССР – разобщение окисления и фосфорилирования) и 1 мкМ ротенона/антимидина А1 (ингибиторы I и III комплексов электронно-транспортной цепи соответственно). Первые три измерения использовались для определения базального дыхания. Во время оценки гликолиза в лунки добавляли 10 мМ D-глюкозы, 1 мкМ олигомицина и 50 мМ 2-дезоксиглюкозы. Мету гликолиза представляли как скорость внеклеточного закисления, достигаемую после добавления избыточных количеств глюкозы. Данные нормировали на содержание белка в каждой лунке.

2.2.8. Получение нокаутных клеток методом CRISPR/Cas9

Для получения нокаутных клеток по белку Вак клеточные линии HeLa и H23 трансфецировали pSpCas9-BB-2A-GFP плазмидой (GenScript), содержащей последовательность (GTTGATGTCGTCCTCCCGATGA) одиночной направляющей

РНК (sgRNA), которая нацелена на ген *BAK1* (GenScript). Плазмиду использовали в конечной концентрации 1 мкг/мл. Липофектамин LTX (Thermo Scientific) использовали для трансфекции в соответствии с инструкцией производителя. Были отобраны GFP-положительные клетки путем сортировки клеток на FACS Aria III (BD Biosciences). Для клеточной линии H23 удалось достичь эффективного нокаута белка Bак, поэтому для проведения экспериментов была взята общая популяция GFP-позитивных клеток. Для клеток HeLa этого добиться не удалось, поэтому были использованы отдельные клоны GFP-позитивных клеток для создания популяций клеток, лишенных Bак. Чтобы исключить неспецифические эффекты редактирования генома CRISPR/Cas9, клетки, нокаутные по белку Bак, сравнивали с контрольными клетками, которые были трансфицированы нецелевой контрольной плазмидой CRISPR/Cas9 sc-418922 (Santa Cruz Biotechnology, конечная концентрация 1 мкг/мл) и отсортированы аналогично соответствующим нокаутным ячейкам. Эти клетки были обозначены как «HeLa, контроль» и «H23, контроль».

2.2.9. Оценка жизнеспособности клеток (MTS-тест)

Анализ основан на расщеплении желтой соли тетразолия MTS (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-5-(3-карбоксиметоксифенил)-2-(4-сульфофенил)-2Н тетразолий) в водорастворимый формазановый продукт оранжевого цвета, растворяющийся непосредственно в культуральной среде. Для проведения исследования клетки высевали в плоскодонные 96-луночные планшеты (Nunc) и культивировали в среде DMEM с добавлением 10% FBS в течение 24 часов. На следующий день культуральную среду меняли на новую с добавлением ингибитора RG7388 в диапазоне концентраций от 10 нМ до 64 мкМ (инкубация 24 часа). Затем добавляли 20 мкл MTS (CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega) в каждую лунку и инкубировали 2,5 часа при 37°C. После инкубации проводили спектрофотометрический анализ при длине волны 480 нм на приборе Varioskan Flash (Thermo Scientific). Значения ингибирующей концентрации (IC50),

при которой процент жизнеспособных клеток представляет собой половину от результатов в контрольной группе, рассчитывали при помощи программы GraphPad Prism 6 (GraphPad Software).

2.2.10. Тест на клоногенную активность

Клетки высевали при низкой конfluэнтности (1000 клеток на лунку в 2 мл культуральной среды) в трех повторностях в 6-луночные планшеты. Затем клетки культивировали в течение 10-14 дней. По истечении времени культивирования клетки дважды промывали раствором PBS, фиксировали 4% раствором параформальдегида в PBS и окрашивали 0,5% кристаллическим фиолетовым в водном растворе. Затем планшеты визуализировали с помощью системы ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad) и анализировали с помощью программного обеспечения ImageJ (Bio-Rad).

2.2.11. Секвенирование нового поколения (NGS)

Геномная ДНК, полученная из клеточных линий SH-SY5Y и SH-SY5Y, устойчивых к действию RG7388, была фрагментирована ультразвуком до среднего размера 300 нуклеотидов. Далее при помощи набора NEBNext® Ultra™ II DNA Library Prep Kit for Illumina (NEB) была приготовлена библиотека согласно методическим рекомендациям к набору. После чего ее использовали для гибридизации с зондами из набора SureSelect Focused Exome (Agilent), который включает зонды для отбора кодирующих частей генов *TP53* и *MDM2*. Затем проводили секвенирование на приборе HiSeq1500 (Illumina) для достижения среднего покрытия 100x. Далее последовательности выравнивали на человеческий геном версии Hg18 и проводили поиск мутаций вручную. Исследование было выполнено совместно с ООО «Геноаналитика».

2.2.12. Анализ данных TCGA

Информация об уровнях мРНК была получена с ресурса cBioPortal (bioportal.org) в виде стандартизированной оценки (z-оценки) значений на основе

базы данных Атласа генома аденокарциномы легких (LUAD TCGA; <https://portal.gdc.cancer.gov/>, по состоянию на 1 сентября 2021 г.) и проанализирована с помощью программного обеспечения R3.6.1. Экспрессия мРНК в виде z-оценки относительно нормальных образцов показывает количество стандартных отклонений от среднего значения экспрессии того же гена в нормальных образцах. Данные об общей выживаемости пациентов с LUAD были получены с ресурса cBioPortal, и было произведено сравнение между несколькими подгруппами пациентов с высокой и низкой экспрессией выбранных генов. «Высокая» и «низкая» экспрессия генов была основана на медиане экспрессии мРНК z-оценки относительно нормальных образцов. Для анализа выживаемости использовался 10-летний диапазон наблюдения. Статистический анализ был выполнен с использованием теста логарифмического ранга с помощью программного обеспечения R3.6.1 с визуализацией при помощи графика Каплана-Мейера. Для учета множественных сравнений использовали поправку Холма-Бонферрони.

2.2.13. Исследование клинических образцов

Послеоперационный материал пациентов с аденокарциномой легкого был собран в Национальном медицинском исследовательском центре (НМИЦ) онкологии им. Н.Н. Блохина в период 2016–2020 гг. После хирургического удаления образцы опухоли замораживали и хранили в жидком азоте. Образцы были получены в соответствии с принципами Комитета по этике НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина (разрешение № 04-04-08097). В ходе исследования образцы опухолевых тканей и соответствующие неопухолевые ткани, которые располагались вдали от участка опухоли и были охарактеризованы как нормальные эпителиальные клетки в ходе гистологического анализа, были получены от 22 пациентов. Все образцы были гомогенизировали с использованием пробирок для лизиса BashingBead (Zymo Research) и гомогенизатора тканей Precellys 24 (Bertin Technologies). Лизирование описано в разделе «Вестерн-блот анализ».

Количественная оценка уровней белков была произведена в ходе денситометрического обсчета в виде отношения нормализованного уровня белка в опухолевой ткани к нормализованному уровню белка в соответствующей нормальной ткани, то есть было представлено соотношение «опухоль/норма» после логарифмирования по основанию два. Подобное представление данных было сделано для корректной оценки изменений белков в патологических тканях. Для нормализации определяли общий пул белка в ходе денситометрии TGX-гелей (Bio-Rad).

2.2.14. Биоинформатический анализ аминокислотных замен

Имеющиеся мутации в структуре p53 были исследованы методами молекулярного моделирования при помощи программного пакета AMBER20 и суперкомпьютерных мощностей. Исследование было проведено совместно с Ниловым Д.К., к.х.н, в.н.с. НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского.

2.2.15. Моделирование опухоли у мышей

В эксперименте были использованы самки мышей NSG (NOD/SCID/IL2r γ null) массой 20–25 г, полученные из питомника лабораторных животных «Пушино» Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН (ИБХ РАН). Животные содержались в специализированном виварии ИБХ РАН. Клетки SH-SY5Y и SH-SY5Y, уст. к действию RG7388, (~3 млн.) были введены мышам подкожно в бессывороточной среде с 30% Matrigel (Corning) в правый бок для создания ксенотрасплантантной модели нейробластомы. После достижения объема опухоли ~50 мм³ (на 5 день после подсадки клеток) 20 мышей были случайным образом поделены на 4 группы (n=5): SH-SY5Y («Контроль»), SH-SY5Y («Доксорубицин»), SH-SY5Y, уст. к RG7388, («Контроль») и SH-SY5Y, уст. к RG7388, («Доксорубицин»). Мышам из групп «Доксорубицин» в/в вводили препарат (3 мг/кг/день после растворения в буфере PBS) три дня подряд (5-7 дни), в то время как контрольным животным вводился 0,9% раствор хлорида натрия. Динамику роста опухоли контролировали с помощью штангенциркуля путем

измерения продольных и поперечных размеров. Объем опухоли рассчитывали как $V = \text{ширина}^2 \times \text{длина} / 2$. На 12 день животные были подвергнуты эвтаназии при помощи углекислого газа. Все процедуры были одобрены Институциональным комитетом по уходу и использованию животных ИБХ РАН (протокол №375/2023). Исследование было проведено совместно с Шипуновой В.О., к.б.н, с.н.с. ИБХ РАН.

2.2.16. Гистологический анализ тканей

Для проведения гистологического анализа опухолевых тканей ксенотрансплантантов были сформированы две дополнительные экспериментальные группы животных: SH-SY5Y («Контроль», N=4) и SH-SY5Y, уст. к RG7388, («Контроль», N=6). Опухоли были получены в тех же условиях (раздел 2.2.15. «Материалы и методы»). После эвтаназии мышей ксенотрансплантаты опухолей были подвергнуты резекции и хранились в 10% нейтральном буферном растворе формалина. Образцы тканей (фиксированные формалином и залитые парафином) окрашивали гематоксилином и эозином. Уровень клеточного обновления (отношение митотического индекса (МИ) к апоптотическому индексу (АИ)) был определен как отношение числа митозов к числу апоптотических клеток и оценен в 10 случайных полях высокого разрешения (10 HPF, $\times 400$) препаратов опухолей, окрашенных гематоксилином и эозином.

Иммуногистохимическое окрашивание было проведено на приборе Ventana BenchMark XT (Ventana Medical-Systems) с использованием первичного антитела Ki-67 (Abcam, ab15580) и DAB Universal ultraView (Ventana Medical-Systems). Вышеуказанное антитело инкубировали при $+37\text{ }^\circ\text{C}$ в течение 16 мин. Уровень окраски маркера Ki-67 был определен путем подсчета числа Ki-67-положительных клеток/500 или более опухолевых клеток в поле зрения микроскопа. Исследование было выполнено совместно с к.б.н., врачом-патологоанатомом НМИЦ акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова МЗ РФ Бадлаевой А.С.

2.2.17. Обработка данных

Обработка результатов измерений, а также статистический анализ данных проводились с помощью программного обеспечения Microsoft Excel и GraphPad Prism 6 (GraphPad Software). На основании полученных данных были построены соответствующие таблицы и графики. Статистический анализ проводился с помощью U-критерия Манна-Уитни, если не указано иное в подписи к рисунку.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. Сравнительный анализ проапоптотической активности антагонистов Mcl-1 S63845 и A1210477

Как уже было сказано, на сегодняшний день наиболее перспективным способом нейтрализации действия антиапоптотического белка Mcl-1 является применение его низкомолекулярных селективных антагонистов, относящихся к классу ВНЗ-миметиков. В ходе предварительных экспериментов были выбраны опухолевые клеточные линии человека (аденокарцинома шейки матки HeLa и аденокарцинома легкого H23), которые отличаются повышенной чувствительностью к подавлению Mcl-1. Кроме того, они относятся к тканям, для которых характерно повышение экспрессии гена белка Mcl-1 в процессе канцерогенеза [70,247].

Первоначально был проведен сравнительный анализ эффективности действия двух антагонистов Mcl-1 S63845 и A1210477 на клеточной линии HeLa в широком диапазоне концентраций методом Вестерн-блот анализа (Рис. 9). Время культивации клеток после добавления ВНЗ-миметиков составило 24 часа.

По результатам Вестерн-блота было выявлено, что оба соединения вели к дозозависимому накоплению Mcl-1, которое является ранее упомянутым характерным маркером взаимодействия ВНЗ-миметиков с данным белком. В то время как уровни других антиапоптотических белков (Bcl-2 и Bcl-xL) не изменились (Рис. 9А). Однако S63845 в более низких концентрациях вел к более выраженному накоплению белка Mcl-1 по сравнению с A1210477. Оценка клеточной гибели была произведена по степени расщепления эффекторной каспазы-3 и белка репарации PARP, который является субстратом эффекторных каспаз. Оба белка представляют собой важнейшие апоптотические маркеры: соотношения проформы каспазы-3 и каталитически активных фрагментов p19/17, а также полноразмерной формы PARP и расщепленного фрагмента p89 отражают интенсивность процесса клеточной гибели [48]. Было продемонстрировано, что

S63845 (3 мкМ) вел к более эффективному запуску апоптоза в сравнении с A1210477 в его максимальной концентрации 10 мкМ (Рис. 9А).

Данные Вестерн-блот анализа были подтверждены результатами проточной цитофлуориметрии с двойным окрашиванием Аннексином V-FITC (далее Аннексин) и йодидом пропидия (ЙП). Данный метод позволяет провести не только количественную оценку запуска клеточной гибели, но и определить ее тип: апоптотические клетки на ранних стадиях имеют неповрежденные мембраны и окрашиваются только аннексином V-FITC за счет специфического связывания последнего с фосфатидилсеринем, который, в свою очередь, появляется на поверхности клеток в ходе запуска апоптоза (Аннексин+/ЙП-); некротические окрашиваются только ЙП (Аннексин-/ЙП+); апоптотические клетки на поздних стадиях окрашиваются и аннексином, и ЙП, которые проникают в клетки с поврежденными мембранами (в клетки с интактными мембранами ЙП не проникает) (Аннексин+/ЙП+); живые клетки не окрашиваются обоими красителями (Аннексин-/ЙП-) [48]. A1210477 (10 мкМ) увеличивал число гибнущих клеток до 18%, в то время как S63845 (3 мкМ) – до 59% (Рис. 9Б). Таким образом, соединение S63845 значительно более эффективно запускало апоптотическую гибель в клетках HeLa по сравнению с A1210477.

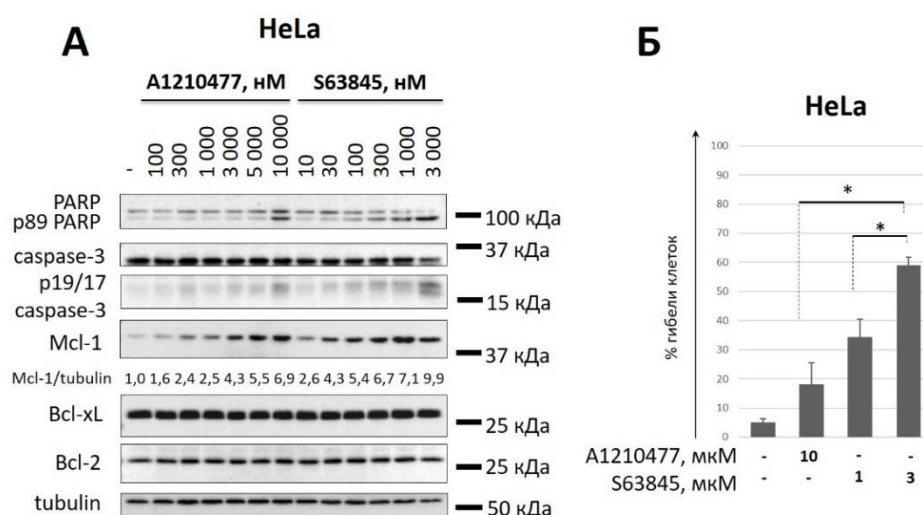


Рис. 9. Анализ эффективности действия антагонистов Mcl-1 A1210477 и S63845. Результаты Вестерн-блот анализа (А) и проточной цитометрии (Аннексин/ЙП) (Б) в клетках HeLa. PARP –

полноразмерная форма белка (116 кДа, сверху) и p89 – фрагмент белка PARP (89 кДа, снизу), маркер апоптоза, образуется в результате действия эффекторных каспаз; p19/17 caspase-3 – каталитически активные фрагменты эффекторной каспазы-3, маркер апоптоза. Mcl-1/tubulin – денситометрический анализ уровня белка Mcl-1 в пересчете на tubulin, который был использован в качестве контроля загрузки геля. % гибели клеток – суммарный процент апоптотических и некротических клеток. Время инкубации клеток после добавления антагониста составляет 24 часа. Данные на гистограмме представлены как среднее \pm стандартное отклонение, n=4; * p<0,05 (U-тест). Опубликовано с модификациями в [248].

3.2. Оценка роли проапоптотических белков семейства Bcl-2 в различной эффективности действия антагонистов Mcl-1 S63845 и A1210477

Ранее было предположено, что причиной низкой эффективности антагониста A1210477 может быть высокое сродство данного соединения к белкам сыворотки [191]. Другой вероятной причиной различий в проапоптотической активности S63845 и A1210477 может являться ограниченность действия последнего. Как уже было отмечено, оба антагониста относятся к группе ВНЗ-миметиков. Эти низкомолекулярные ингибиторы разрушают комплексы Mcl-1 с его проапоптотическими партнерами, что ведет к увеличению количества несвязанных ВНЗ-only белков и эффекторных белков семейства Bcl-2 и, в конечном итоге, к запуску апоптоза. Mcl-1 способен образовывать комплексы с различными проапоптотическими белками семейства Bcl-2, среди которых наибольшим сродством к Mcl-1 обладает Bax [134,249]. Поэтому разница в эффективности действия двух исследуемых ВНЗ-миметиков может определяться степенью влияния данных соединений на разрушение комплексов Mcl-1/Bax.

Для проверки этой гипотезы был осуществлен нокдаун Bax с помощью метода РНК-интерференции с последующей оценкой клеточной гибели при действии S63845 (1 и 3 мкМ) и A1210477 (10 мкМ) в клетках HeLa методами Вестерн-блот анализа и проточной цитометрии (Рис. 10). Кроме того, был осуществлен нокдаун двух других проапоптотических членов семейства Bcl-2: белка Bim, который наряду с Bax является одним из двух основных эффекторных белков, и белка Bid,

что взаимодействует с широким спектром антиапоптотических белков семейства Bcl-2 и, в отличие от Noxa и Puma, не индуцируется транскрипцией p53 в ответ на стрессовые условия [53]. Таким образом, к клеткам HeLa добавляли миРНК к соответствующим белкам (Bak, Bax, Bim), а к контрольным клеткам добавляли нецелевую миРНК – NT. Время инкубации при трансфекции и после добавления ВНЗ-миметиков составляло 24 часа.

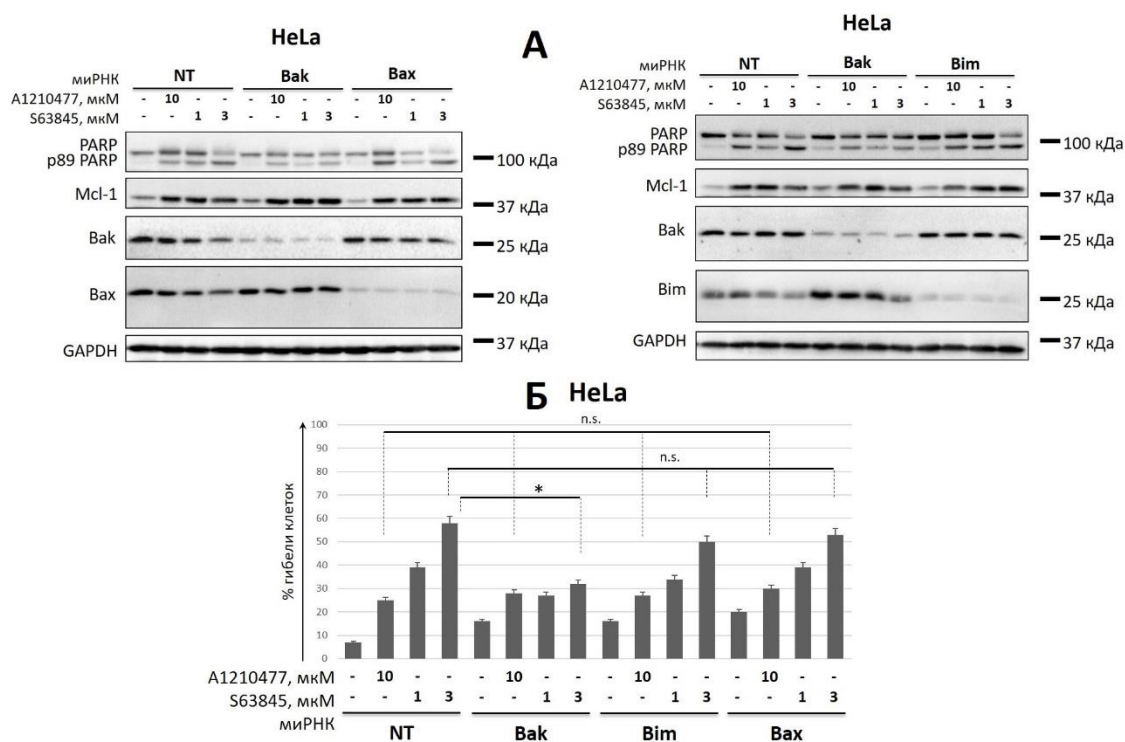


Рис. 10. Оценка влияния нокдауна белков Bak, Bax и Bim на эффективность антагонистов Mcl-1 A1210477 и S63845 в клетках HeLa. Результаты Вестерн-блот анализа (А) и проточной цитометрии (Аннексин/ЙП) (Б) в клетках HeLa. PARP и p89 PARP – полноразмерная форма белка и его расщепленный фрагмент, соответственно; Белок GAPDH был использован в качестве контроля загрузки геля; миРНК к Bak (#1), Bax (#1), Bim (#9), NT – нецелевая миРНК. Время трансфекции – 24 часа; время инкубации клеток после добавления антагонистов – 24 часа; % гибели клеток – суммарный процент апоптотических и некротических клеток. Данные на гистограмме представлены как среднее \pm стандартное отклонение, n=4; * p<0,05, n.s. – статистически не значимо (U-тест). Опубликовано с модификациями в [248].

По данным Вестерн-блот анализа, нокдаун проапоптотических белков Bak, Bax и Bim не приводил к значительному изменению степени расщепления белка

PARP в случае A1210477 (10 мкМ), что подтверждается результатами проточной цитометрии, где не наблюдается статистически значимого уменьшения популяции погибших клеток. Аналогичные результаты были получены при нокдауне белков Bax и Bim для S63845 (1 и 3 мкМ). В то же время нокдаун Bак оказывал влияние на степень индукции апоптоза при использовании S63845, причем эффект был дозозависимым: при меньшей дозе S63845 (1 мкМ) это влияние было менее выражено (по результатам цитометрического анализа доля погибших клеток уменьшалась на 11%), однако при повышении концентрации S63845 до 3 мкМ нокдаун белка Bак вел к значительному уменьшению расщепления полноразмерной формы белка PARP и накопления его фрагмента p89, а также к снижению популяции гибнущих клеток HeLa с 58% до 32% (Рис. 10).

Полученные в ходе двух независимых методов оценки клеточной гибели результаты свидетельствуют о том, что разрушение комплексов между антиапоптотическим белком Mcl-1 и эффекторным белком Bак является ключевым условием для эффективной индукции апоптоза при использовании ВНЗ-миметиков Mcl-1. Было обнаружено, что в основе увеличения эффективности запуска апоптотической гибели для соединения S63845 при повышении концентрации лежит Bак-зависимый механизм, в то время как для A1210477 нокдаун белка Bак не влиял на его проапоптотическую активность. При этом дальнейшее увеличение концентраций для A1210477 является нецелесообразным ввиду его низкой селективности в высоких дозах [189,191], как уже было отмечено. Таким образом, антагонист S63845 более эффективно запускает апоптотическую гибель по сравнению с A1210477 за счет более полного разрушения комплексов Mcl-1/Bак, поэтому дальнейшие эксперименты по ингибированию Mcl-1 в рамках настоящего исследования проводились только с участием соединения S63845.

Для исключения нецелевого эффекта нокдауна белков, опосредованного использованием миРНК, был проведен дополнительный эксперимент на клеточной линии HeLa с применением Вестерн-блот анализа, при этом нокдаун белков Bак,

Вах и Vim осуществлялся двумя различными миРНК в аналогичных условиях (Рис. 11).

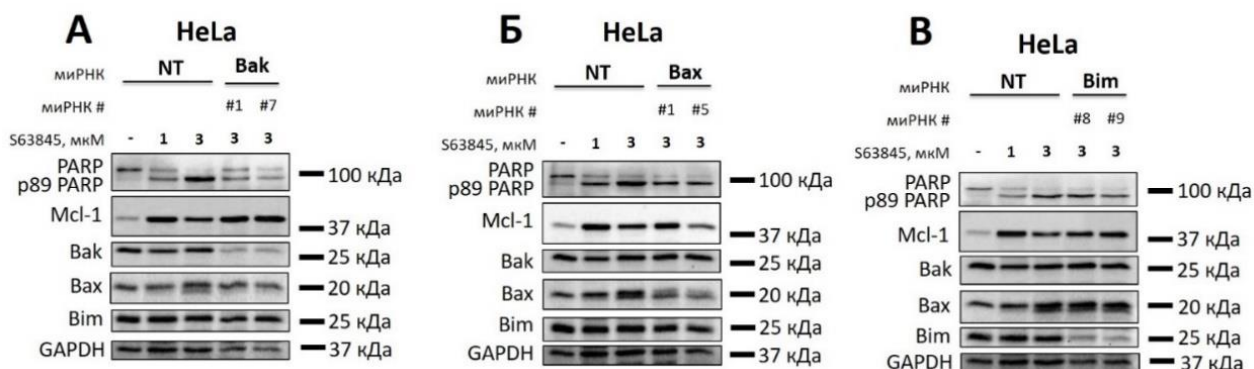


Рис. 11. Оценка влияния различных миРНК при нокдауне белков Вах, Вах и Vim на эффективность ВНЗ-миметика Mcl-1 S63845 в клетках HeLa методом Вестерн-блот анализа. PARP и p89 PARP – полноразмерная форма белка и его расщепленный фрагмент соответственно; Белок GAPDH был использован в качестве контроля загрузки геля; миРНК к Вах (#1 и #7), Вах (#1 и #5), Vim (#8 и #9), NT – нецелевая миРНК. Время трансфекции – 24 часа; время инкубации клеток после добавления S63845 – 24 часа. Опубликовано с модификациями в [248].

В ходе оценки клеточной гибели (степень расщепления белка PARP и образование его фрагмента p89) полностью подтвердились ранее полученные данные о роли белка Вах в запуске апоптотической гибели при действии S63845, при этом обе миРНК в случае каждого нокдауна (Вах, Вах или Vim) действовали одинаковым образом.

На следующем этапе было исследовано, является ли Вах-зависимый механизм проапоптотической активности S63845 специфичным только для клеток HeLa. С этой целью был произведен нокдаун белков Вах, Вах и Vim методом РНК-интерференции на клеточной линии H23 с последующим добавлением S63845. Время трансфекции и время инкубации клеток после добавления ингибитора составило 24 часа (Рис. 12).

Согласно результатам проточной цитометрии, антагонист S63845 (1 мкМ и 3 мкМ) приводил к увеличению размера популяции погибших клеток линии HeLa до 36% и 59% от общего числа клеток соответственно (Рис. 12А). В то же время в

клетках H23 повышение концентрации S63845 до 3 мкМ не вело к существенному увеличению гибели по сравнению с 1 мкМ этого ингибитора (Рис. 12Б). Поэтому для линии H23 были выбраны более низкие (по сравнению с клетками HeLa) дозы ВНЗ-миметика – 0,3 мкМ и 1 мкМ.

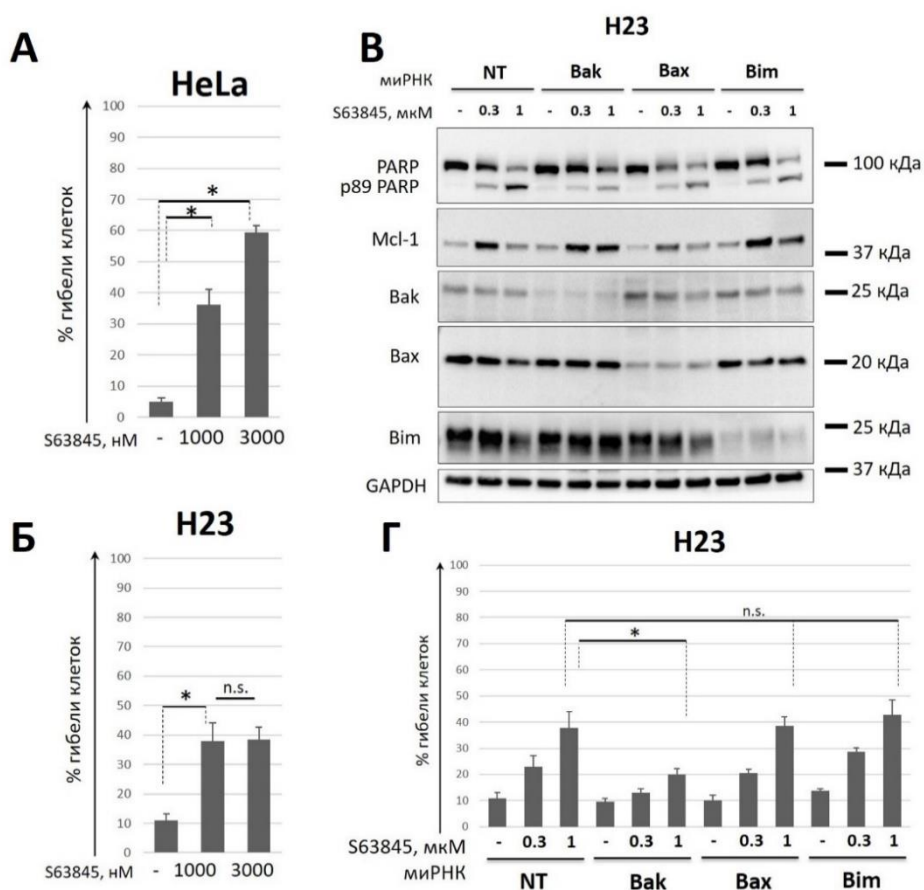


Рис. 12. Оценка влияния нокдауна белков Bak, Bax и Bim на эффективность антагониста Mcl-1 S63845 в клетках H23. Результаты проточной цитометрии (Аннексин/ЙП) в клетках HeLa (А), H23 (Б и Г) и Вестерн-блот анализа (В) в клетках H23. PARP и p89 PARP – полноразмерная форма белка и его расщепленный фрагмент соответственно; Белок GAPDH был использован в качестве контроля загрузки геля; миРНК к Bak (#1), Bax (#1), Bim (#9), NT – нецелевая миРНК. Время трансфекции – 24 часа; время инкубации клеток после добавления антагонистов - 24 часа; % гибели клеток – суммарный процент апоптотических и некротических клеток. Данные на гистограмме представлены как среднее \pm стандартное отклонение, n=4; * p<0,05, n.s. – статистически не значимо (U-тест). Опубликовано с модификациями в [133] (А) и в [248] (Б, В и Г).

Было обнаружено, что нокдаун белков Вах и Вим, как и в клетках HeLa, не приводил к существенным изменениям расщепления белка PARP по результатам Вестерн-блот анализа и статистически значимому снижению популяции гибнущих клеток по данным проточной цитометрии. Однако подавление белка Вак снижало клеточную гибель при действии S63845 (0,3 мкМ и 1 мкМ), о чем свидетельствовало уменьшение образования фрагмента р89 PARP и расщепления его полноразмерной формы (Рис. 12В). Полученные данные были подтверждены в ходе цитометрического анализа: наблюдалось снижение доли погибших клеток с 23% до 13% (0,3 мкМ S63845) и с 38% до 20% (1 мкМ S63845) (Рис. 12Г). Таким образом, в клетках H23 также наблюдался Вак-опосредованный механизм проапоптотической активности S63845, который происходил дозозависимым образом.

Также было проанализировано, является ли вклад белка Вак специфичным в запуске апоптоза при ингибировании Mcl-1, или же этот эффект наблюдается при любом апоптотическом стимуле. С этой целью была произведена оценка клеточной гибели при использовании химиотерапевтического препарата Цисплатина, относящегося к группе ДНК-повреждающих агентов, в клетках HeLa и H23 в условиях нокдауна белков Вак, Вах и Вим методами Вестерн-блот анализа и проточной цитометрии (Аннексин/ЙП). Время трансфекции и время последующей инкубации клеток с Цисплатином составило 24 часа (Рис. 13).

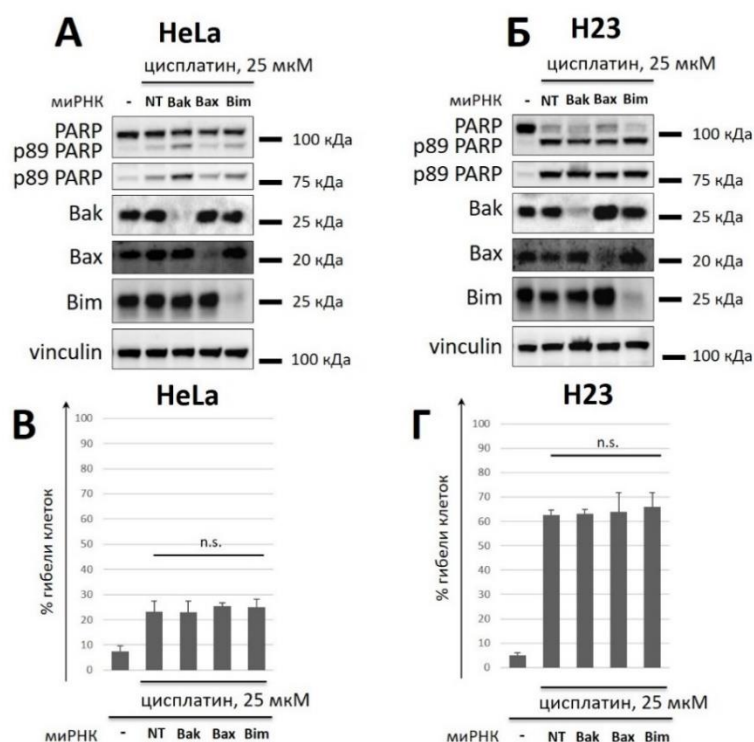


Рис. 13. Оценка влияния нокдауна белков Bak, Bax и Bim на эффективность химиопрепарата Цисплатина в клетках HeLa и H23. Результаты Вестерн-блот анализа в клетках HeLa (A) и H23 (Б) и проточной цитометрии (Аннексин/ЙП) в клетках HeLa (В) и H23 (Г). PARP и p89 PARP – полноразмерная форма белка и его расщепленный фрагмент соответственно; белок vinculin был использован в качестве контроля загрузки геля; миРНК к Bak (#1), Bax (#1), Bim (#9), NT – нецелевая миРНК. Время трансфекции – 24 часа; время инкубации клеток после добавления Цисплатина – 24 часа; % гибели клеток – суммарный процент апоптотических и некротических клеток. Данные на гистограммах представлены как среднее ± стандартное отклонение, n=4; * p<0,05, n.s. – статистически не значимо (U-тест). Опубликовано с модификациями в [248].

При помощи двух независимых методов было установлено, что клетки H23 проявляют большую чувствительность к действию Цисплатина по сравнению с клетками HeLa. Так, например, согласно данным цитометрического анализа, Цисплатин в концентрации 25 мкМ вел к повышению размера популяции гибнущих клеток до 23% и 63% на клеточных линиях HeLa и H23 соответственно. При этом подавление белков Bak, Bax и Bim не оказывало влияния на

проапоптотическую активность Цисплатина (Рис. 13). Эти результаты показывают специфичную роль Bak при запуске апоптоза, вызванного ингибированием Mcl-1.

Наконец, для дополнительного подтверждения Bak-опосредованного механизма проапоптотической активности S63845 были проведены эксперименты с клетками HeLa и H23 в условиях полного нокаута Bak, полученных методом редактирования генов CRISPR/Cas9. Оценка гибели клеток осуществлялась методами Вестерн-блот анализа и проточной цитометрии (Аннексин/ЙП). Время инкубации клеток после добавления S63845 (1 и 3 мкМ) или Цисплатина (25 мкМ) составляло 24 часа (Рис. 14).

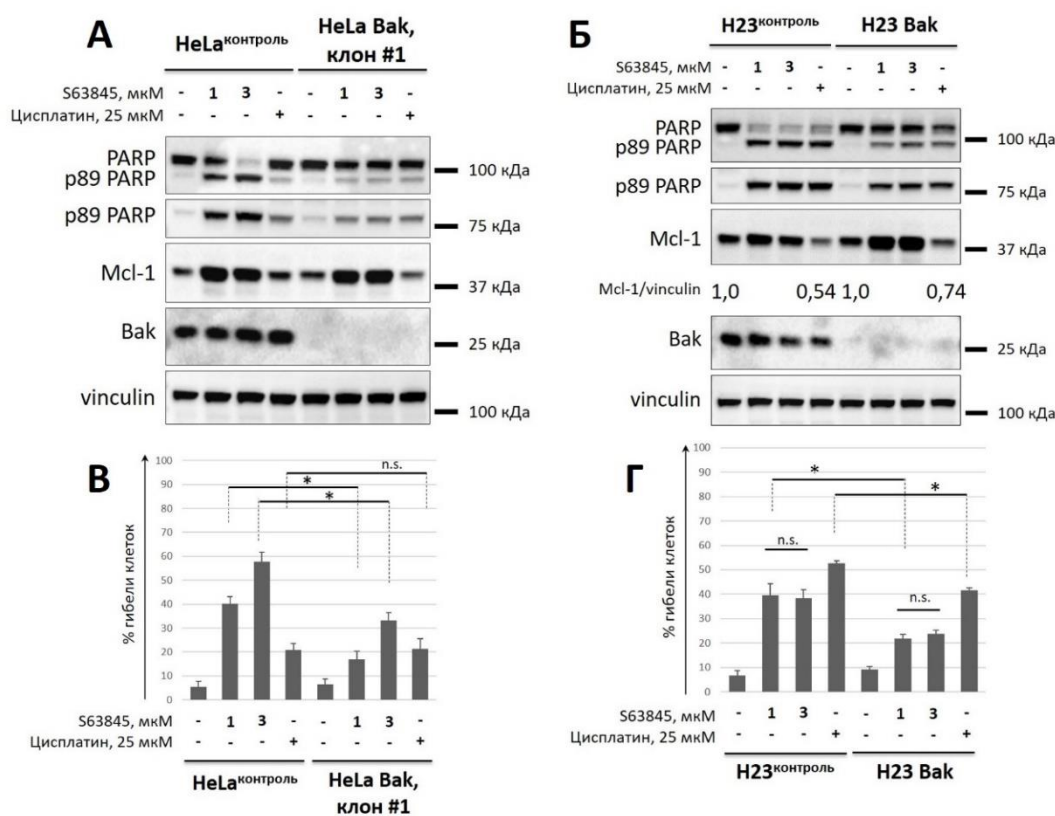


Рис. 14. Оценка влияния нокаута белка Bak методом CRISPR/Cas9 на эффективность ВНЗ-миметика S63845 и химиопрепарата Цисплатина в клетках HeLa и H23. Результаты Вестерн-блот анализа в клетках HeLa (А) и H23 (Б) и проточной цитометрии (Аннексин/ЙП) в клетках HeLa (В) и H23 (Г). PARP и p89 PARP – полноразмерная форма белка и его расщепленный фрагмент соответственно; Mcl-1/vinculin – денситометрический анализ уровня белка Mcl-1 в пересчете на vinculin, который был использован в качестве контроля загрузки геля; время инкубации клеток после добавления Цисплатина или S63845 – 24 часа; % гибели клеток –

суммарный процент апоптотических и некротических клеток. Данные на гистограммах представлены как среднее \pm стандартное отклонение, $n=4$; * $p<0,05$, n.s. – статистически не значимо (U-тест). Подробное описание получения клеток, нокаутных по гену белка Vak, и контрольных клеток методом CRISPR/Cas9 приведено в соответствующем разделе «Материалы и методы». Опубликовано с модификациями в [248].

На клеточной линии HeLa полный нокаут Vak, как и случае подавления этого белка методом РНК-интерференции, значительным образом снижал проапоптотическую активность S63845, о чем свидетельствует выраженное уменьшение расщепления белка PARP (Рис. 14А) и данные цитометрического анализа, согласно которым размер популяции погибших клеток уменьшался с 40% до 17% и с 58% до 33% при 1 и 3 мкМ S63845 соответственно (Рис. 14В). При этом нокаут Vak не оказывал влияния на Цисплатин-индуцируемую клеточную гибель (Рис. 14А, В). В клетках H23 отсутствие белка Vak аналогичным образом сказывалось на проапоптотической активности S63845, однако несколько снижало клеточную гибель, вызванную Цисплатином (Рис. 14Б, Г). Данное обстоятельство может быть связано с изначальной высокой чувствительностью линии H23 к действию Цисплатина, а также частичным подавлением белка Mcl-1 под его действием (Рис. 14Б).

Таким образом, полученные результаты указывают на то, что белок Vak является одним из ключевых предикторных факторов, определяющих чувствительность опухолевых клеток к ингибированию Mcl-1 посредством ВНЗ-миметиков.

3.3. Изучение механизмов устойчивости опухолевых клеток к действию антагониста Mcl-1 S63845

Как уже было отмечено, для опухолевых клеток характерно приобретение устойчивости к различным химиотерапевтическим препаратам, применяемым в ходе лечения онкологических заболеваний. В связи с этим понимание механизмов, лежащих в основе развития такой устойчивости, и поиск возможных способов ее

преодоления являются одними из ключевых проблем современной медицины. Для получения клеток, обладающих повышенной устойчивостью к действию ВНЗ-миметика S63845, были использованы линии HeLa, H23, а также клетки нейробластомы SK-N-Be(2)c, которые также характеризуются повышенной чувствительностью к подавлению Mcl-1, что было подтверждено при помощи Вестерн-блот анализа по степени расщепления белка PARP (Рис. 15А) и проточной цитофлуориметрии методом subG1 (Рис. 15Б). Данный тип цитометрического анализа определяет размер популяции погибших клеток, которые детектируются в фазе subG1 появлением фрагментированной ДНК вследствие активности эндонуклеаз в ходе процесса апоптоза. Для анализа распределения клеток по содержанию ДНК использовался краситель ЙП, который может связываться с ДНК. Размер популяции клеток в фазе subG1 отражает интенсивность апоптотической гибели [47,48]. Было выявлено, что добавление S63845 в концентрации 1 мкМ и 3 мкМ вело к повышению фракции клеток в фазе subG1 до 19% и 31% соответственно (Рис. 15Б).

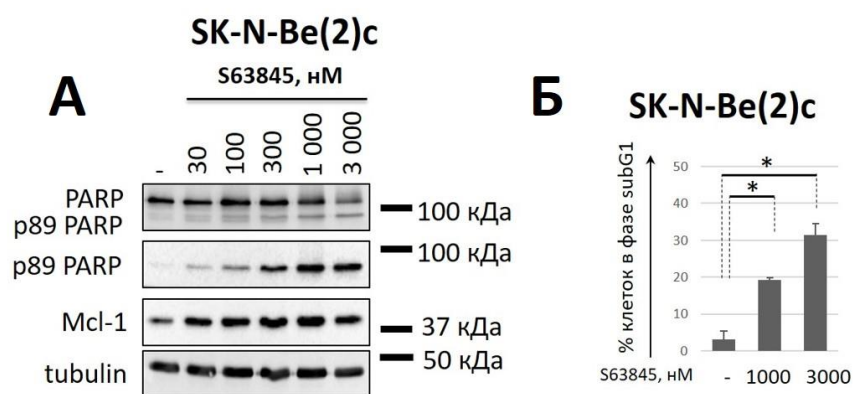


Рис. 15. Оценка клеточной гибели при действии антагониста Mcl-1 S63845. (Результаты Вестерн-блот анализа (А) и данные цитометрического анализа методом subG1 (Б) в клетках SK-N-Be(2)c. PARP и p89 PARP – полноразмерная форма белка и его расщепленный фрагмент соответственно. Белок tubulin был использован в качестве контроля загрузки геля. Время инкубации клеток после добавления антагониста составляет 24 часа. Данные на гистограммах представлены как среднее \pm стандартное отклонение, n=4; * p<0,05 (U-тест).

Для получения клеток, устойчивых к действию S63845, был использован «пульсовый» подход: исходные клеточные линии культивировали с постепенно возрастающими концентрациями данного антагониста Mcl-1. При этом периоды культивации клеток после добавления препарата чередовались с периодами «восстановления», когда клетки культивировались в стандартных условиях (без добавления противоопухолевого агента). Данная стратегия является клинически значимой, поскольку имитирует курсы химиотерапии онкологических пациентов [250].

Культивация клеток начиналась с относительно низких концентраций S63845 (до 500 нМ – I этап). Время инкубации клеток с препаратом составляло 24 часа. После чего из-за высокой цитотоксичности S63845 проводилась замена культуральной среды на новую (без антагониста Mcl-1), в которой выжившие клетки росли 4 дня. Затем проводили пересадку клеток и цикл повторяли заново. После 3 циклов был проведен II этап, в котором использовались микромолярные концентрации S63845. Для клеток H23 максимальная концентрация данного антагониста на II этапе составила 1 мкМ. В этих условиях клетки находились также в течение 3 циклов (Рис. 16).

Развитие устойчивости к различным лекарственным препаратам, в том числе к противораковым соединениям, может быть обусловлено повышением экспрессии генов белков множественной лекарственной устойчивости, которые представляют собой АТФ-зависимые мембранные транспортные белки и обеспечивают экспорт многих веществ из клеток. Одним из наиболее изученных транспортеров лекарственных соединений является Р-гликопротеин [251,252]. Для предотвращения обратного выброса химиопрепарата за счет действия Р-гликопротеина, повышенный уровень которого часто встречается в опухолевых клетках, при выведении устойчивых линий клеток использовали препарат Верапамил (50 мкМ), ингибитор Р-гликопротеина.

Получение опухолевых клеток с повышенной устойчивостью к действию S63845

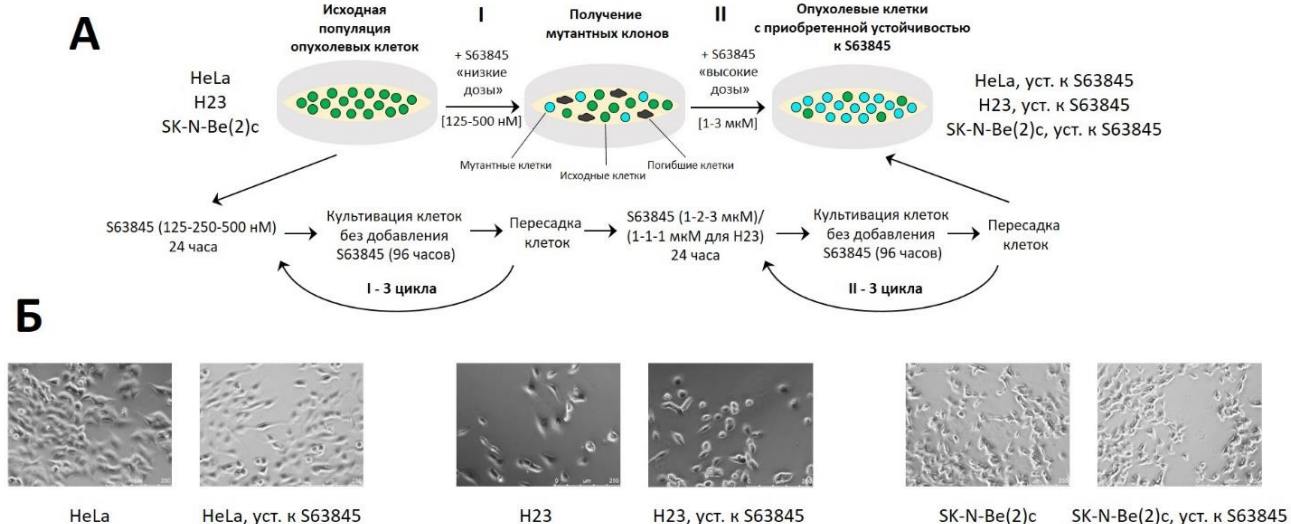


Рис. 16. Схема выведения и изображения клеточных линий HeLa, H23 и SK-N-Be(2)c, характеризующихся повышенной устойчивостью к действию S63845. А. Схема получения устойчивых к ингибированию Mcl-1 клеточных популяций. Б. Репрезентативные изображения исходных и устойчивых клеточных линий HeLa, H23 и SK-N-Be(2)c, полученные при использовании фазово-контрастного светового микроскопа (Leica AF6000 LX). Шкала – 250 мкм.

Далее был проведен сравнительный анализ чувствительности исходных клеточных линий и выведенных устойчивых к ингибированию Mcl-1. Был использован широкий диапазон концентраций (250 нМ – 3 мкМ) S63845 на клетках HeLa, H23 и SK-N-Be(2)c. Клеточная гибель была оценена методами Вестерн-блот анализа и проточной цитометрии. Время инкубации после добавления соответствующих доз S63845 составило 24 часа (Рис. 17-19).

Было обнаружено, что клетки HeLa, длительно инкубированные с S63845, проявляют значительно меньшую чувствительность к действию S63845 по сравнению с исходными клетками HeLa. Данный эффект был особенно выражен при использовании микромолярных доз ВНЗ-миметика, о чем наглядно свидетельствуют уровни расщепления апоптотических маркеров - белков каспазы-3 и PARP (Рис. 17А). Кроме того, различия в ответе на ингибирование Mcl-1 подтверждаются данными проточной цитометрии с окрашиванием Аннексин/ЙП:

размер популяции погибших клеток для линии HeLa, уст. уменьшался с 39% до 27% и с 63% до 37% при 1 и 3 мкМ S63845 соответственно (Рис. 17Б).

Было предположено, что в устойчивых клетках могут меняться уровни экспрессии антиапоптотических белков семейства Bcl-2. Так, ранее для селективного антагониста Bcl-2 Венетоклакса было установлено, что приобретенная устойчивость к ингибированию одного антиапоптотического белка может быть связана с повышением экспрессии генов других антиапоптотических белков [205]. В ходе Вестерн-блот анализа было выявлено статистически значимое повышение содержания белка Bcl-xL в клетках HeLa, уст. по сравнению с исходной популяцией, при этом уровень другого антиапоптотического белка Bcl-2 не изменился (Рис. 17В). Следовательно, белок Bcl-xL может являться еще одним предикторным фактором, определяющим чувствительность опухолевых клеток к действию ВНЗ-миметиков Mcl-1, и отвечать за развитие их устойчивости к данным препаратам.

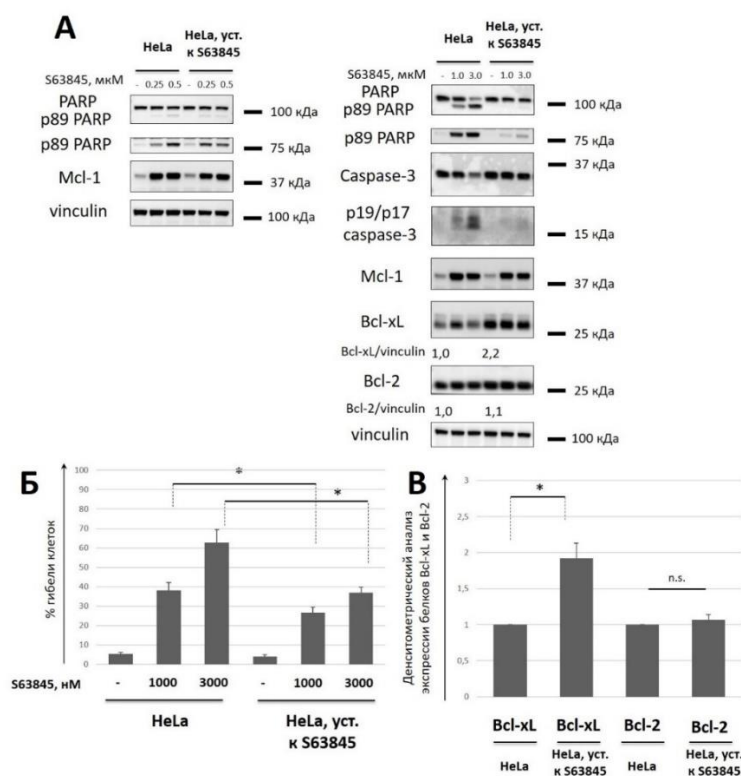


Рис. 17. Сравнительный анализ клеточной гибели при действии ВНЗ-миметика S63845 и уровней антиапоптотических белков Bcl-2 семейства в клетках HeLa и HeLa, уст. к S63845.

Результаты Вестерн-блот анализа (А), проточной цитометрии с окрашиванием Аннексин/ЙП (Б) и денситометрического анализа (В) в клетках HeLa и HeLa, уст. к S63845. PARP и p89 PARP – полноразмерная форма белка и его расщепленный фрагмент соответственно, p19/17 caspase-3 – каталитически активные фрагменты эффекторной каспазы-3; Vcl-xL/vinculin и Vcl-2/vinculin – денситометрический анализ уровней соответствующих белков в пересчете на vinculin, который был использован в качестве контроля загрузки геля; время инкубации клеток после добавления S63845 (0.25 – 3 мкМ) – 24 часа; % гибели клеток – суммарный процент апоптотических и некротических клеток. Данные на гистограммах представлены как среднее \pm стандартное отклонение, n=4; * p<0,05, n.s. – статистически не значимо (U-тест).

Аналогичное исследование было проведено на клеточных линиях H23 и SK-N-Be(2)c (Рис. 18-19). По результатам двух независимых методов исследования (Вестерн-блот анализ и проточная цитометрия с окрашиванием Аннексин/ЙП) было выявлено, что клетки H23, уст. к S63845, проявляют значительно меньшую чувствительность по сравнению с исходными клетками H23 к действию S63845 в диапазоне концентраций от 0,25 мкМ до 1 мкМ. Однако доза 3 мкМ, которая не приводила к увеличению гибели исходных клеток в сравнении 1 мкМ, вела к преодолению устойчивости к S63845 (Рис. 18А-Б). Кроме того, несмотря на наличие выраженной устойчивости к антагонисту Mcl-1 в наномолярных концентрациях в клетках H23, уст. к S63845, не наблюдалось изменений в уровнях белков Vcl-2 и Vcl-xL (Рис. 18В).

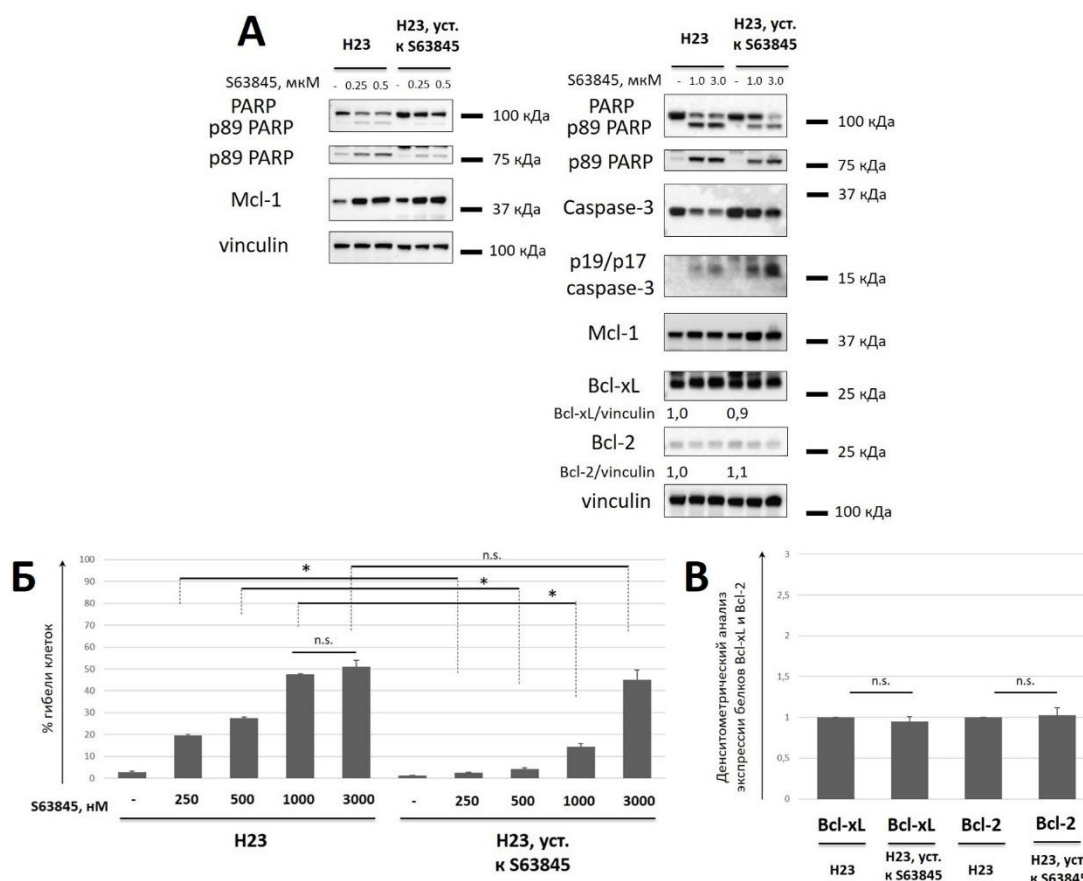


Рис. 18. Сравнительный анализ клеточной гибели при действии ВНЗ-миметика S63845 и уровней антиапоптотических белков Bcl-2 семейства в клетках H23 и H23, уст. к S63845. Результаты Вестерн-блот анализа (А), проточной цитометрии с окрашиванием Аннексин/ЙП (Б) и денситометрического анализа (В) в клетках H23 и H23, уст. к S63845. PARP и p89 PARP – полноразмерная форма белка и его расщепленный фрагмент соответственно, p19/17 caspase-3 – каталитически активные фрагменты эффекторной каспазы-3; Bcl-xL/vinculin и Bcl-2/vinculin – денситометрический анализ уровней соответствующих белков в пересчете на vinculin, который был использован в качестве контроля загрузки геля; время инкубации клеток после добавления S63845 (0.25 – 3 мкМ) – 24 часа; % гибели клеток – суммарный процент апоптотических и некротических клеток. Данные на гистограммах представлены как среднее \pm стандартное отклонение, n=4; * p<0,05, n.s. – статистически не значимо (U-тест).

В отличие от клеток H23, клетки SK-N-Be(2)c, уст. к S63845, обладают меньшей чувствительностью к действию к S63845 по сравнению с исходными клетками SK-N-Be(2)c во всем исследуемом диапазоне доз антагониста Mcl-1 (0,25 мкМ – 3 мкМ) согласно данным Вестерн-блота и цитометрического анализа

методом subG1 (Рис. 19А-Б). Более того, устойчивые клетки характеризуются повышенным уровнем белка Bcl-2, при этом уровень Bcl-xL не меняется (Рис. 19В).

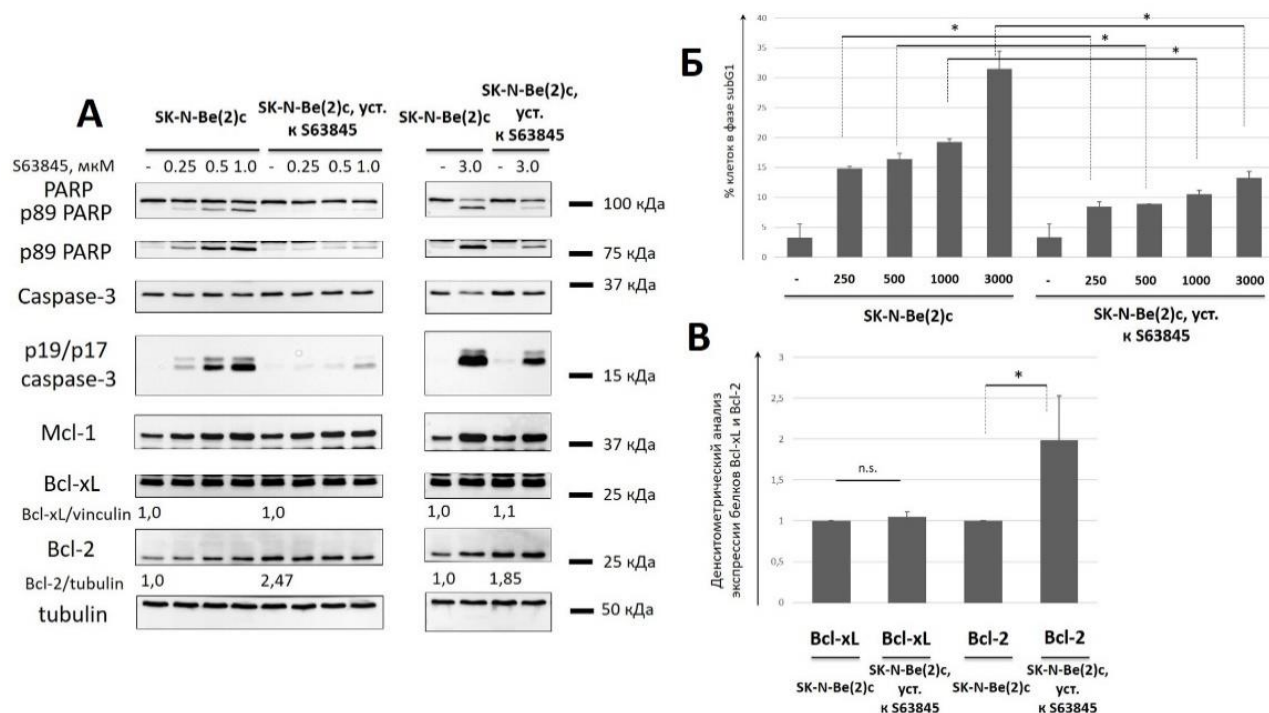


Рис. 19. Сравнительный анализ клеточной гибели при действии ВНЗ-миметика S63845 и уровней антиапоптотических белков Bcl-2 семейства в клетках SK-N-Be(2)c и SK-N-Be(2)c, уст. к S63845. Результаты Вестерн-блот анализа (А), проточной цитометрии методом subG1 (Б) и денситометрического анализа (В) в клетках SK-N-Be(2)c и SK-N-Be(2)c, уст. к S63845. PARP и p89 PARP – полноразмерная форма белка и его расщепленный фрагмент соответственно, p19/17 caspase-3 – каталитически активные фрагменты эффекторной каспазы-3; Bcl-xL/tubulin и Bcl-2/tubulin – денситометрический анализ уровней соответствующих белков в пересчете на tubulin, который был использован в качестве контроля загрузки геля. Время инкубации клеток после добавления S63845 (0.25 – 3 мкМ) – 24 часа; % гибели клеток – суммарный процент апоптотических и некротических клеток. Данные на гистограммах представлены как среднее \pm стандартное отклонение, n=4; * p<0,05, n.s. – статистически не значимо (U-тест).

Было предположено, что изменения уровней антиапоптотических белков Bcl-2 и Bcl-xL в устойчивых к ингибированию Mcl-1 опухолевых клетках связаны с усилением транскрипции соответствующих генов (*BCL2* кодирует одноименный белок, а *BCL2L1* – Bcl-xL). С этой целью был проведен анализ экспрессии мРНК генов соответствующих белков методом ПЦР в реальном времени. Было

установлено, что в клетках HeLa, уст. к S63845 по сравнению с материнской популяцией происходит увеличение мРНК Bcl-xL, но не меняется уровень мРНК Bcl-2. Схожая картина наблюдалась в клетках SK-N-Be(2)c, уст. к S63845, но в отношении другого антиапоптотического белка: отмечалось повышение мРНК Bcl-2 и отсутствие изменений в уровне мРНК Bcl-xL (Рис. 20). Полученные результаты полностью согласуются с ранее приведенными данными Вестерн-блот анализа. Следовательно, в ходе получения устойчивых к действию S63845 опухолевых клеток выживали мутантные клоны, в которых на транскрипционном уровне происходило увеличение экспрессии генов белков Bcl-2 или Bcl-xL.

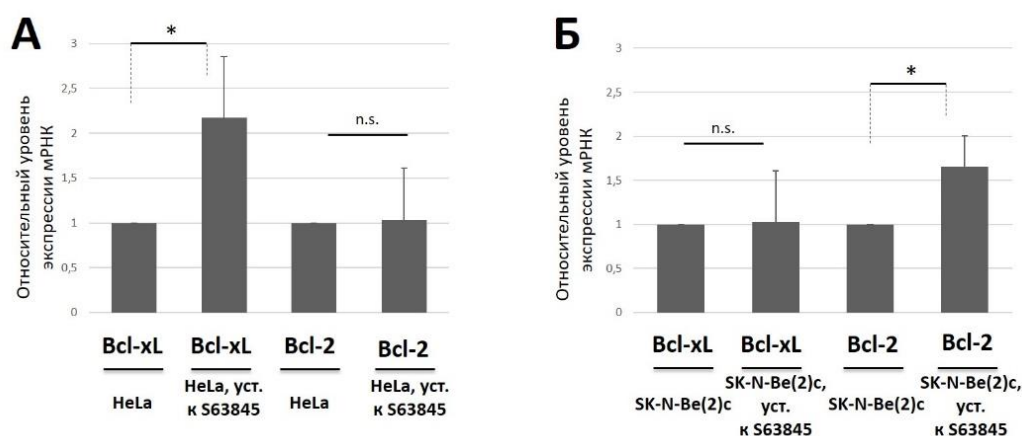


Рис. 20. Оценка уровня мРНК экспрессии генов *BCL2* и *BCL2L1* в клетках HeLa и HeLa, уст. к S63845 (А) и SK-N-Be(2)c и SK-N-Be(2)c, уст. к S63845 (Б). Данные на гистограммах представлены как среднее \pm стандартное отклонение, n=4; * $p < 0,05$, n.s. – статистически не значимо (U-тест). Пояснения к результатам приведены в соответствующем разделе «Материалы и методы» и указаны в тексте.

Изменения уровней антиапоптотических белков семейства Bcl-2 в опухолевых клетках, обладающих повышенной устойчивостью к действию S63845, могут вести к уменьшению вклада белка Mcl-1 в их выживаемость по сравнению с исходными популяциями. Для проверки этой гипотезы была проведена сравнительная оценка клеточной гибели при генетическом подавлении Mcl-1 методом РНК-интерференции в материнских и устойчивых клетках HeLa, H23 и SK-N-Be(2)c.

Анализ гибели проводился при помощи Вестерн-блота и проточной цитометрии спустя 24 часа после трансфекции клеток миРНК к Mcl-1 (Рис. 21).

При помощи Вестерн-блота и проточной цитометрии было установлено, что в клетках H23 и H23, уст. к S63845 не наблюдалось статистически значимых различий в числе гибнущих клеток при генетическом подавлении Mcl-1. Так, по данным цитометрического анализа, доля гибнущих клеток составляла 25% и 21% соответственно (Рис. 21Д). В то же самое время две остальные клеточные линии, обладающие повышенной устойчивостью к ингибитору Mcl-1 и измененным профилем экспрессии генов антиапоптотических белков, проявляли меньшую чувствительность в ответ на трансфекцию миРНК к Mcl-1 по сравнению с исходным пулом клеток как по степени расщепления апоптотических маркеров (Рис. 21А, В), так и в ходе проточной цитометрии: в случае HeLa число погибших клеток уменьшалось с 45% до 30%, а в для SK-N-Be(2)c процент фракции subG1 снижался с 17,9% до 7,8% (Рис. 21Г, Е).

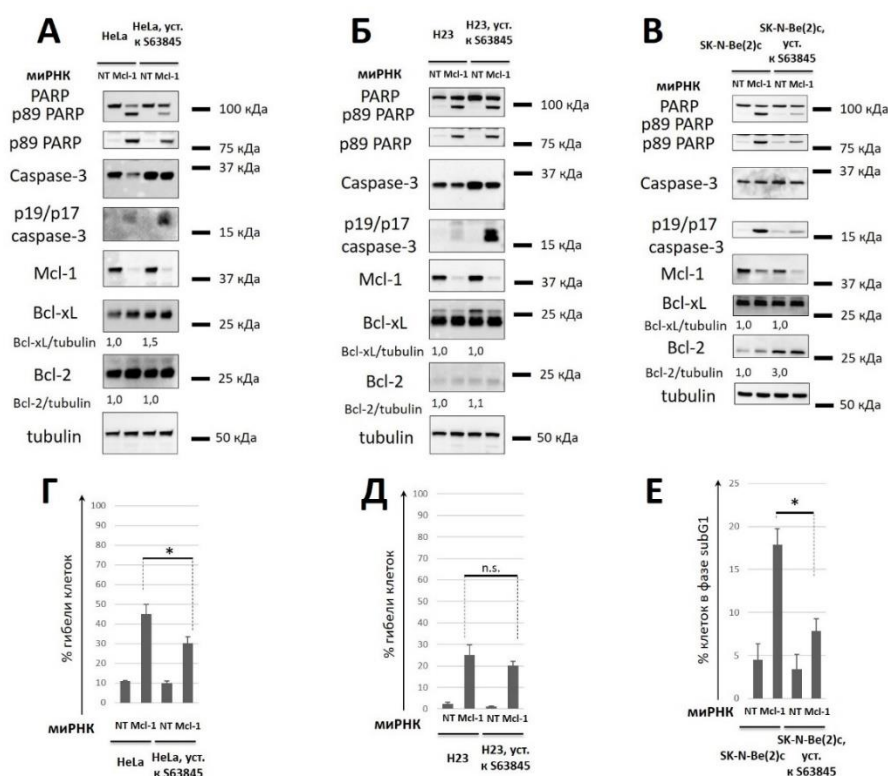


Рис. 21. Оценка клеточной гибели при подавлении Mcl-1 методом РНК-интерференции. А-В. Результаты Вестерн-блот анализа в материнских и устойчивых к действию S63845 клетках

HeLa (А), H23 (Б) и SK-N-Be(2)c (В). Г-Д. Данные цитометрического анализа с окрашиванием Аннексин/ЙП в клетках HeLa/HeLa, уст. к S63845 (Г) и H23/H23, уст. к S63845 (Д). Е. Данные цитометрического анализа методом subG1 в клетках SK-N-Be(2)c/SK-N-Be(2)c, уст. к S63845. PARP – полноразмерная форма белка (116 кДа, сверху) и p89 – фрагмент белка PARP (89 кДа, снизу); p19/17 caspase-3 – каталитически активные фрагменты эффекторной каспазы-3. Белок tubulin был использован как контроль загрузки геля. % гибели клеток – суммарный процент апоптотических и некротических клеток. Время инкубации клеток после трансфекции составляет 24 часа. NT – нецелевая миРНК. Данные на гистограммах представлены как среднее \pm стандартное отклонение, n=4; n.s. – статистически не значимо, * p<0,05 (U-тест).

Таким образом, были выведены три клеточные линии различного происхождения, которые обладали повышенной устойчивостью к ингибированию Mcl-1 при действии ВНЗ-миметика S63845. В двух из них наблюдалось повышение уровня других антиапоптотических белков: в случае HeLa – Bcl-xL, а в клетках SK-N-Be(2)c – Bcl-2. Более того, эти клетки были менее чувствительны к генетическому подавлению Mcl-1 при помощи РНК-интерференции. Это подтверждает ранее выявленные закономерности, согласно которым ингибирование одного антиапоптотического белка может приводить к увеличению экспрессии гена другого. Однако пример клеток H23 показывает, что изменение уровней антиапоптотических белков является не единственной причиной приобретенной устойчивости опухолевых клеток к S63845-опосредованному блокированию Mcl-1. Возможным объяснением такого типа резистентности может быть появление мутаций в гене целевого белка (Mcl-1) или в генах эффекторных белков (Bak и Bax), ведущих к нарушению их функциональной активности.

3.4. Оценка эффективности применения антагонистов Bcl-2 и Bcl-xL для преодоления устойчивости опухолевых клеток к ингибированию Mcl-1

Ранее было обнаружено, что совместное использование различных ВНЗ-миметиков является перспективным направлением в терапии онкологических заболеваний, так как одновременное ингибирование двух антиапоптотических белков ведет к синергетическому эффекту и позволяет преодолеть устойчивость

опухолевых клеток к отдельным ВНЗ-миметикам [7]. В рамках данного исследования была изучена целесообразность применения селективных антагонистов Bcl-2 и Bcl-xL для преодоления резистентности опухолевых клеток HeLa, H23 и SK-N-Be(2)c к S63845.

Первоначально была оценена комбинация S63845 и Венетоклакса. Время инкубации после добавления соответствующих доз ингибиторов составило 24 часа (Рис. 22).

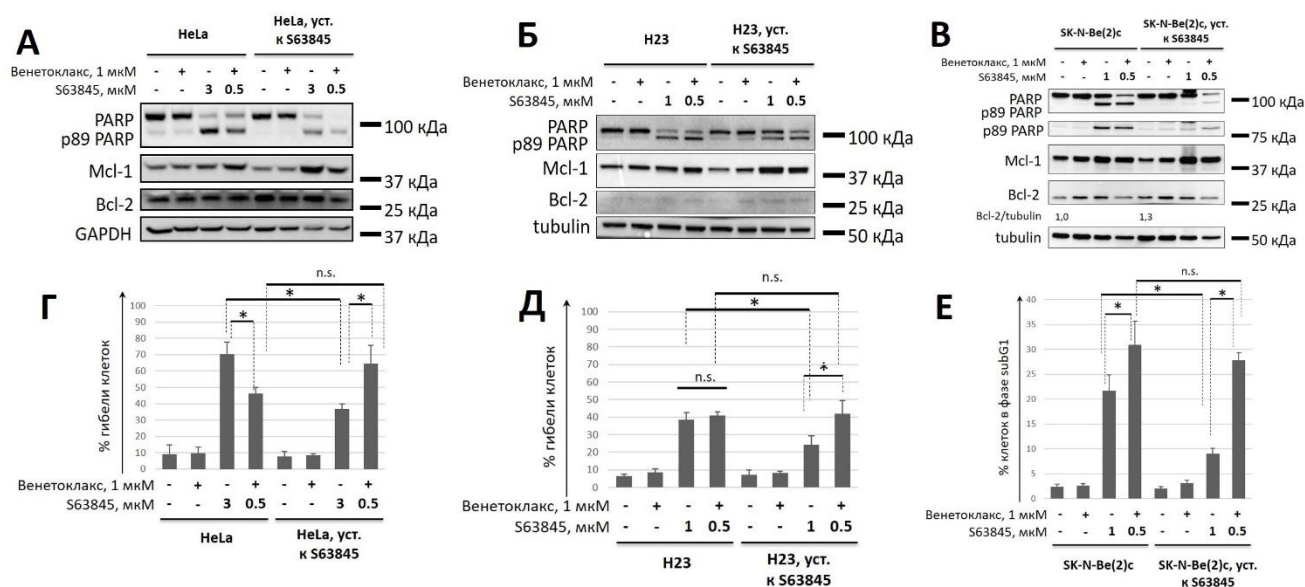


Рис. 22. Оценка эффективности применения Венетоклакса для преодоления устойчивости клеток к S63845. А-В. Результаты Вестерн-блот анализа в материнских и устойчивых к действию S63845 клетках HeLa (А), H23 (Б) и SK-N-Be(2)c (В). Г-Д. Данные цитометрического анализа с окрашиванием Аннексин/ЙП в клетках HeLa/HeLa, уст. к S63845 (Г) и H23/H23, уст. к S63845 (Д). Е. Данные цитометрического анализа методом subG1 в клетках SK-N-Be(2)c/SK-N-Be(2)c, уст. к S63845. PARP – полноразмерная форма белка (116 кДа, сверху) и p89 – фрагмент белка PARP (89 кДа, снизу). Белки GAPDH и tubulin были использованы как контроль загрузки геля. % гибели клеток – суммарный процент апоптотических и некротических клеток. Время инкубации клеток после добавления ингибиторов составляет 24 часа. Данные на гистограммах представлены как среднее ± стандартное отклонение, n=4; n.s. – статистически не значимо, * p<0,05 (U-тест). Опубликовано с модификациями в [248].

Было установлено, что в исходных клетках HeLa комбинация Венетоклакса (1 мкМ) и S63845 (500 нМ) вела к меньшему запуску апоптоза по сравнению с 3 мкМ

S63845 согласно данным Вестерн-блота (степень расщепления PARP) и результатам цитометрического анализа (размер популяции погибших клеток составлял 70% и 47% соответственно). В то же самое время в клетках H23 и SK-N-Be(2)c, где максимальная доза S63845 составляла 1 мкМ, наблюдалась иная картина: доля гибнущих клеток не изменялась (H23) или увеличивалась (SK-N-Be(2)c). Однако во всех трех линиях по данным двух независимых методов исследования комбинация Венетоклакса (1 мкМ) и S63845 (500 нМ) приводила к сравнимому уровню цитотоксичности как для исходной популяции клеток, так и для клеток, характеризующихся повышенной устойчивостью к S63845 (Рис. 22). Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о целесообразности совместного применения антагонистов Bcl-2 и Mcl-1, поскольку Венетоклакс ведет к преодолению резистентности опухолевых клеток к действию S63845 и позволяет снизить дозу ВНЗ-миметика Mcl-1 до 500 нМ, что может уменьшить риски потенциальных побочных эффектов, связанных с ингибированием Mcl-1 в нормальных клетках.

Далее был проведен анализ комбинации антагонистов Bcl-xL (A1331852) и Mcl-1 (S63845) на предмет преодоления приобретенной устойчивости опухолевых клеток к действию последнего (Рис. 23). В ходе предварительных экспериментов была обнаружена высокая чувствительность опухолевых клеток к совместному ингибированию Bcl-xL и Mcl-1, поэтому были выбраны низкие концентрации ВНЗ-миметиков (оба – 100 нМ), а время инкубации клеток после их добавления составило 6 часов. По данным Вестерн-блот анализа, эта комбинация препаратов вела к существенному запуску гибели всех исследуемых клеточных линий (как исходных, так и устойчивых к S63845), что наглядно показывает степень расщепления апоптотических маркеров (полных форм каспазы-3 и PARP) и уровень накопления фрагмента p89 PARP и каталитически активных фрагментов p19/17 эффекторной каспазы-3 (Рис. 23А-В). В случае увеличения концентраций ВНЗ-миметиков до 1 мкМ, а времени инкубации клеток до 24 часов наблюдается практически полная гибель клеток SK-N-Be(2)c, о чем свидетельствует деградация

большинства белков, в том числе и тубулина (Рис. 23Г). Цитометрический анализ (метод subG1) подтверждает результаты Вестерн-блот анализа (Рис. 23Д).

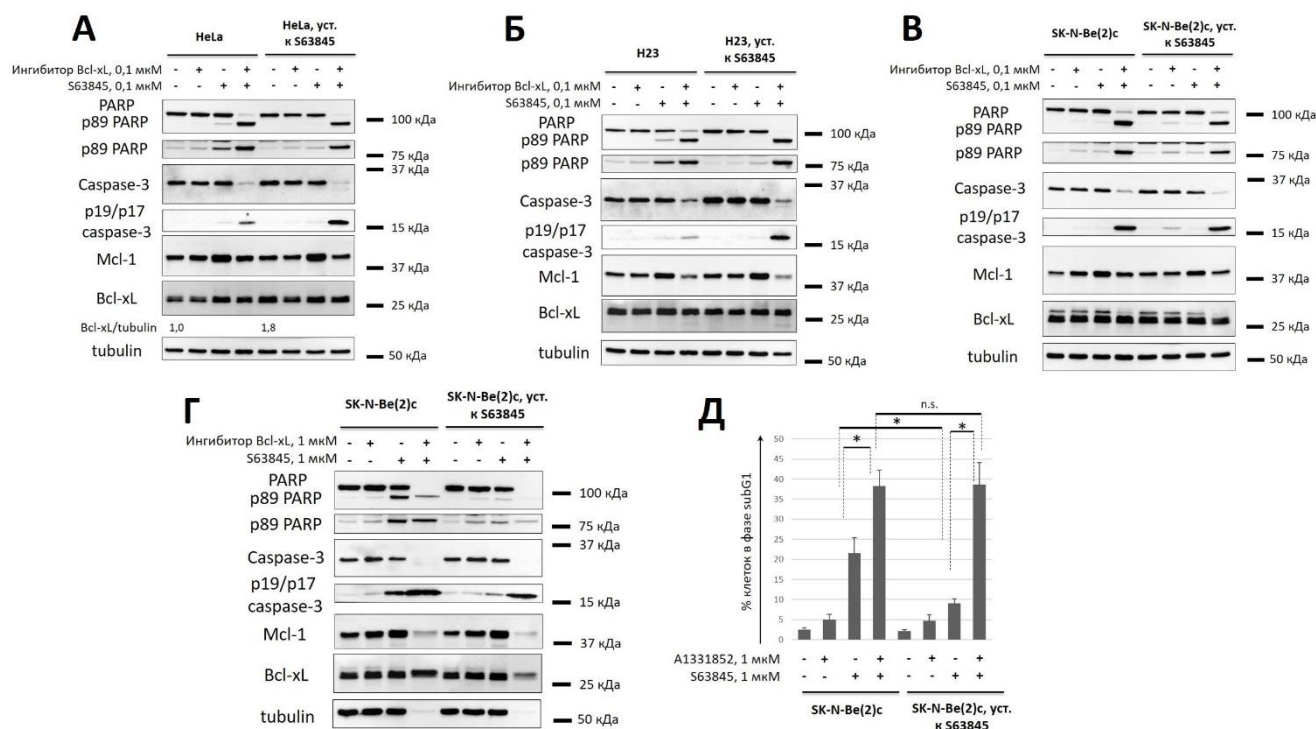


Рис. 23. Оценка эффективности применения ингибитора Bcl-xL (A1331852) для преодоления устойчивости клеток к S63845. А-В. Результаты Вестерн-блот анализа в материнских и устойчивых к действию S63845 клетках HeLa (А), H23 (Б) и SK-N-Be(2)c (В). Г-Д. Данные Вестерн-блот анализа (Г) и цитометрического анализа методом subG1 (Д) в клетках SK-N-Be(2)c/SK-N-Be(2)c, уст. к S63845. Время инкубации клеток после добавления ингибиторов составляет 6 часов (А-В) и 24 часа (Г-Д). PARP – полноразмерная форма белка (116 кДа, сверху) и p89 – фрагмент белка PARP (89 кДа, снизу); p19/17 caspase-3 – каталитически активные фрагменты эффекторной каспазы-3. Белок tubulin был использован как контроль загрузки геля. Данные на гистограмме представлены как среднее \pm стандартное отклонение, n=4; n.s. – статистически не значимо, * p<0,05 (U-тест).

Белки Mcl-1 и Bcl-xL обладают наибольшим сродством к эффекторному белку Bак среди остальных антиапоптотических белков семейства Bcl-2, поэтому было предположено, что выраженная цитотоксичность при совместном использовании A1331852 и S63845 обусловлена Bак-опосредованным запуском апоптотической гибели, то есть определяется разрушением комплексов Mcl-1/Bак и Bcl-xL/Bак.

Для проверки этой гипотезы были осуществлены эксперименты по оценке клеточной гибели при одновременном ингибировании Mcl-1 и Bcl-xL в клетках HeLa и H23 с нокаутом Bak. Оценка клеточной гибели проводилась спустя 6 часов после добавления соответствующих концентраций ВНЗ-миметиков (Рис. 24).

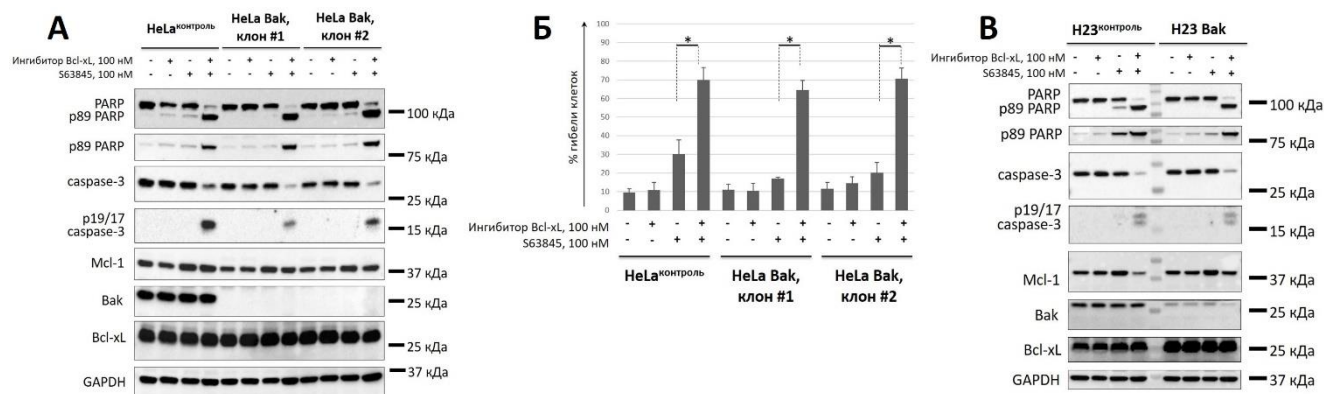


Рис. 24. Оценка влияния нокаута Bak на эффективность запуска клеточной гибели при совместном ингибировании Mcl-1 (S63845) и Bcl-xL (A13311852) в клетках HeLa и H23. Результаты Вестерн-блот анализа в клетках HeLa (А) и H23 (В) и проточной цитометрии (Аннексин/ЙП) в клетках HeLa (Б). PARP – полноразмерная форма белка (116 кДа, сверху) и p89 – фрагмент белка PARP (89 кДа, снизу); p19/17 caspase-3 – каталитически активные фрагменты эффекторной каспазы-3. Белок GAPDH был использован как контроль загрузки геля. Время инкубации клеток после добавления ВНЗ-миметиков – 6 часов; % гибели клеток – суммарный процент апоптотических и некротических клеток. Данные на гистограмме представлены как среднее \pm стандартное отклонение, n=4; * p<0,05, n.s. – статистически не значимо (U-тест). Для исключения специфичных эффектов отдельных клонов были исследованы два клона клеток HeLa, нокаутных по белку Bak. Подробное описание получения клеток, нокаутных по гену белка Bak, и контрольных клеток методом CRISPR/Cas9 приведено в соответствующем разделе «Материалы и методы». Опубликовано с модификациями в [248].

Было обнаружено, что, по данным Вестерн-блот анализа (степень расщепления белков каспазы-3 и PARP), полный нокаут Bak не приводит к уменьшению клеточной гибели при одновременном использовании антагонистов Mcl-1 и Bcl-xL в клетках HeLa и H23 (Рис. 24А, В). Эти результаты были подтверждены в ходе цитометрического анализа в клетках HeLa: в условиях подавления белка Bak не происходило снижения размера популяции мертвых

клеток при комбинаторном действии A1331852 и S63845 (Рис. 24Б). Таким образом, сочетание этих препаратов приводило к значительной цитотоксичности даже в отсутствие эффекторного белка Ваk, не подтверждая тем самым гипотезу о его ключевой роли в реализации апоптоза при подавлении Mcl-1 и Bcl-xL.

После получения таких результатов был проведен дополнительный эксперимент, в ходе которого клеточная гибель, вызванная сочетанием A1331852 и S63845, оценивалась не только в условиях нокаута Ваk, но и при подавлении другого эффекторного белка Ваx методом РНК-интерференции (Рис. 25).

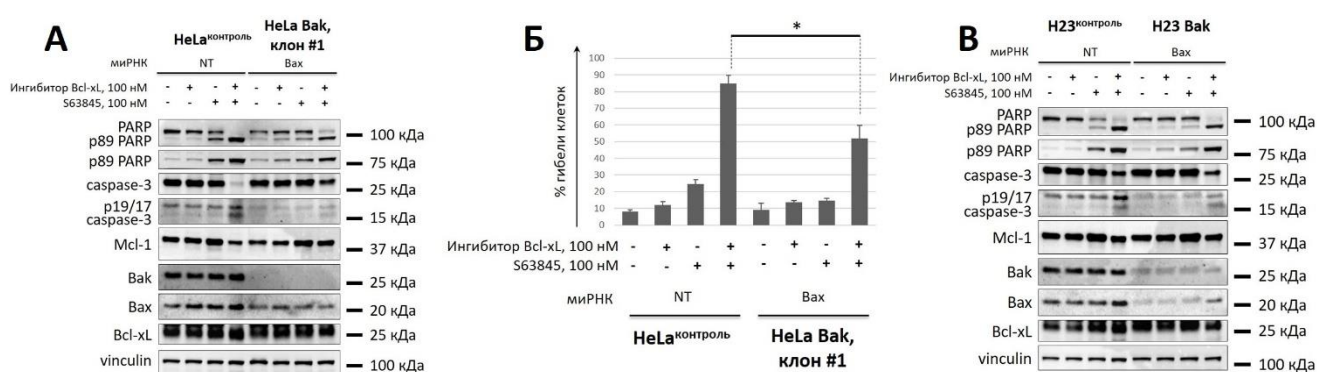


Рис. 25. Оценка влияния нокаута Ваk и одновременного подавления белка Ваx методом РНК-интерференцией на эффективность запуска клеточной гибели при совместном ингибировании Mcl-1 (S63845) и Bcl-xL (A13311852) в клетках HeLa и H23. Результаты Вестерн-блот анализа в клетках HeLa (А) и H23 (В) и проточной цитометрии (Аннексин/ЙП) в клетках HeLa (Б). PARP – полноразмерная форма белка (116 кДа, сверху) и p89 – фрагмент белка PARP (89 кДа, снизу); p19/17 caspase-3 – каталитически активные фрагменты эффекторной каспазы-3. Белок GAPDH был использован как контроль загрузки геля. Время инкубации клеток после добавления ВНЗ-миметиков – 6 часов; % гибели клеток – суммарный процент апоптотических и некротических клеток. Данные на гистограмме представлены как среднее ± стандартное отклонение, n=4; * p<0,05, n.s. – статистически не значимо (U-тест). Подробное описание получения клеток, нокаутных по гену белка Ваk, и контрольных клеток методом CRISPR/Cas9 приведено в соответствующем разделе «Материалы и методы». Опубликовано с модификациями в [248].

В ходе Вестерн-блот анализа было выявлено, что в клетках HeLa в данных условиях наблюдалось уменьшение апоптотической гибели, о чем свидетельствует

меньшая степень расщепления белков PARP и эффекторной каспазы-3, а также более низкий уровень накопления фрагментов p19/17 каспазы-3 и p89 PARP по сравнению с клетками HeLa без подавления белков Bак и Вах (Рис. 25А). Это согласуется с данными проточной цитометрии: размер популяции погибших клеток уменьшался с 85% (исходные клетки) до 52% (клетки, дефицитные по белкам Bак и Вах) (Рис. 25Б). В то же время одновременное подавление Bак и Вах не оказывало существенного влияния на запуск апоптоза в клетках H23 при добавлении A1331852 и S63845 (Рис. 25В). Таким образом, это означает, что даже низкий уровень белка Вах может быть достаточным для эффективной индукции клеточной гибели при одновременном ингибировании Mcl-1 и Bcl-xL для некоторых опухолевых клеток, например, для линии H23.

Таким образом, было установлено, что антагонисты других антиапоптотических белков (Bcl-2 и Bcl-xL) в комбинации с S63845 способны преодолевать приобретенную устойчивость опухолевых клеток к действию последнего. Однако наиболее рациональной стратегией лечения онкологических заболеваний является сочетание Венетоклакса с S63845, поскольку комбинация последнего с ингибитором Bcl-xL ведет к выраженной цитотоксичности даже при существенном снижении уровня эффекторных белков, что может вызвать опасные побочные эффекты у пациентов в ходе клинического применения.

3.5. Оценка белков семейства Bcl-2 в качестве потенциальных прогностических маркеров аденокарциномы легкого

Для изучения потенциальной практической значимости ВНЗ-миметиков в лечении злокачественных солидных опухолей в рамках данной работы был проведен анализ уровней мРНК и белков семейства Bcl-2 в тканях аденокарциномы легкого. Первоначально была получена информация об уровне транскрипции мРНК при помощи ресурса cBioPortal (bioportal.org) в виде стандартизированной оценки (z-оценки) значений на основе базы данных Атласа генома аденокарциномы легких (LUAD TCGA; <https://portal.gdc.cancer.gov/>, по состоянию

на 1 сентября 2021 г.). Согласно этим данным, уровень мРНК антиапоптотических членов семейства Bcl-2 (Bcl-2, Mcl-1 и Bcl-xL) был ниже в опухолевых тканях по сравнению с нормальными тканями. В то же самое время для проапоптотических белков (Bax, Bax, Bim и Bid) наблюдалась обратная картина (Рис. 26А). Для подтверждения полученных данных по уровню мРНК был проведен Вестерн-блот анализ клинических образцов опухолевой легочной ткани и прилегающих неопухолевых участков у пациентов с диагностированной аденокарциномой легкого в НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина. Количественная оценка изменений белкового профиля была осуществлена в ходе денситометрии и представлена в виде соотношения «опухоль/норма» для всех образцов (Рис. 26Б, В).

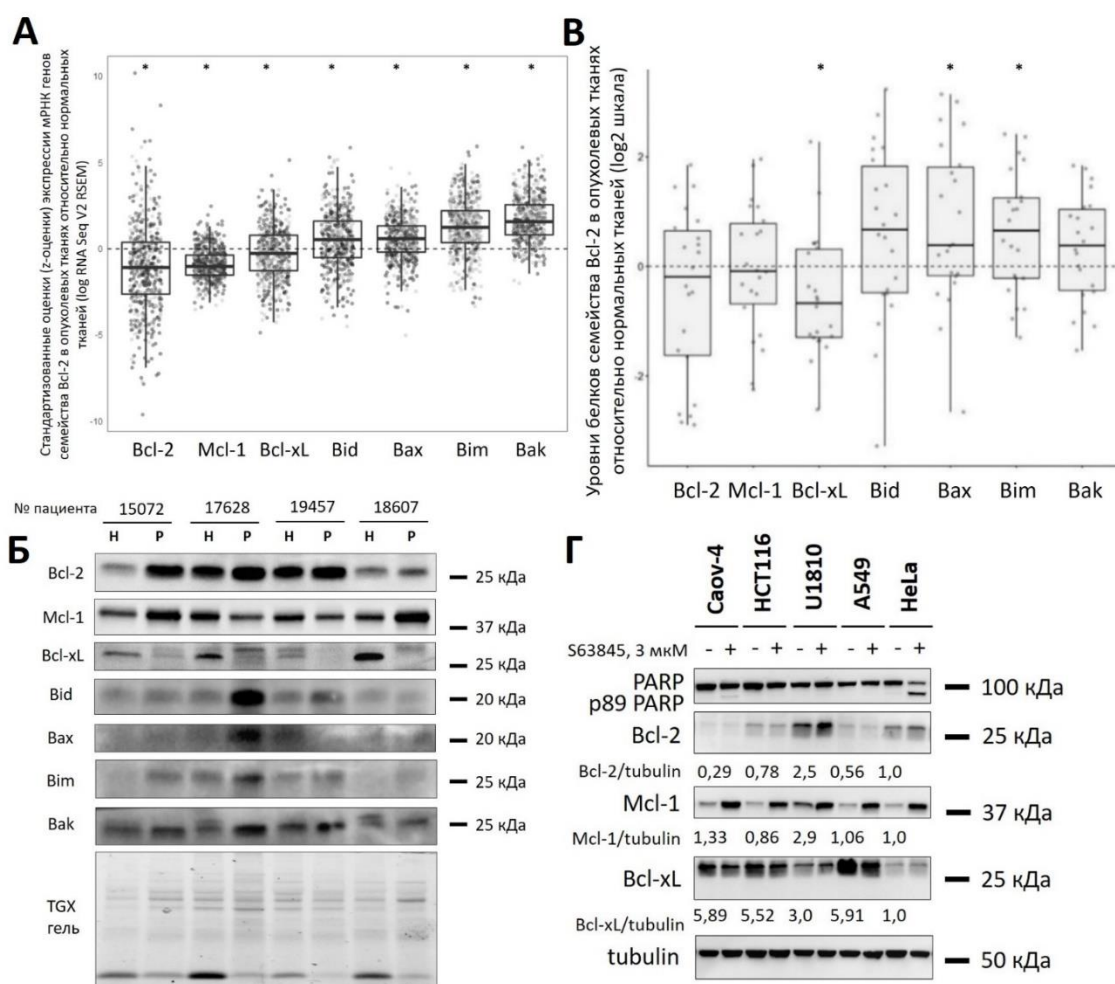


Рис. 26. Оценка уровней белков семейства Bcl-2 в качестве потенциальных прогностических маркеров аденокарциномы легкого. А. Стандартизованные оценки (z-оценки) уровней мРНК генов семейства Bcl-2 в опухолевых тканях относительно нормальных

тканей (log RNA Seq V2 RSEM). Б. Репрезентативный Вестерн-блот клинических образцов пациентов (n=4) с аденокарциномой легкого. В. Данные денситометрического анализа всего пула клинических образцов (n=22) по уровню белков семейства Bcl-2 в виде соотношения «опухоль/норма» после нормализации на TGX гели и логарифмирования по основанию 2. Г. Результаты Вестерн-блот анализа по уровням антиапоптотических белков Bcl-2 семейства в опухолевых клеточных линиях. PARP – полноразмерная форма белка (116 кДа, сверху) и p89 – фрагмент белка PARP (89 кДа, снизу). Белок tubulin был использован как контроль загрузки геля (Г). Время инкубации клеток после добавления S63845 – 24 часа. * p<0,05. Пояснения к результатам приведены в соответствующем разделе «Материалы и методы». Опубликовано с модификациями в [248].

Обнаружено, что в патологических тканях повышается экспрессия проапоптотических белков (Bak, Bax, Bim и Bid), при этом уровни антиапоптотических белков (Bcl-2, Mcl-1 и, в особенности, Bcl-xL) снижаются, что полностью согласуется с результатами анализа мРНК, полученными из открытой базы данных. Важно отметить, что такой белковый профиль антиапоптотических членов семейства Bcl-2 наблюдается у опухолевых клеток, обладающих чувствительностью к действию S63845, что представлено в ходе Вестерн-блот анализа на примере клеток HeLa и четырех опухолевых клеточных линий различного происхождения, не обладающих чувствительностью к ингибированию Mcl-1 (Рис. 26Г). В клетках аденокарциномы легкого (A549 и U1810), аденокарциномы яичника (Caov-4), колоректального рака (HCT116) обнаружен высокий уровень Bcl-xL по сравнению с клетками HeLa. При этом в клетках U1810 также наблюдаются высокие уровни других антиапоптотических белков: Mcl-1 и Bcl-2. Эти закономерности также были отмечены в полученных в ходе выполнения данной работы клеточных линиях с приобретенной устойчивостью к S63845: было выявлено повышение уровня Bcl-xL в устойчивых к S63845 HeLa клетках и Bcl-2 – в устойчивых SK-N-Be(2)c клетках.

Кроме того, был произведен анализ выживаемости пациентов с аденокарциномой легкого по данным базы LUAD TCGA (N=510). Были сформированы четыре подгруппы пациентов в зависимости от уровня

антиапоптотического белка Bак и антиапоптотических белков Mcl-1 и Bcl-xL. Повышенный или пониженный уровень белков определялся на основе медианы стандартизированных оценок (z-оценки) мРНК экспрессии генов семейства Bcl-2 по отношению к нормальным тканям (Рис. 27А, Б). Следует отметить, что выживаемость пациентов с пониженным уровнем Bcl-xL и повышенным уровнем Bак значительным образом зависела от уровня Mcl-1. Так, сопутствующая повышенная экспрессия гена Mcl-1 была связана с плохим прогнозом, в то время как пониженная экспрессия гена Mcl-1 коррелировала с наиболее благоприятным прогнозом по сравнению со всеми остальными подгруппами пациентов (Рис. 27В). Поскольку белок Bак является предикторным фактором, определяющим чувствительность опухолевых клеток к действию антагонистов Mcl-1, применение последних может иметь высокий терапевтический потенциал для пациентов с повышенным уровнем Bак и пониженными уровнями Mcl-1 и Bcl-xL.

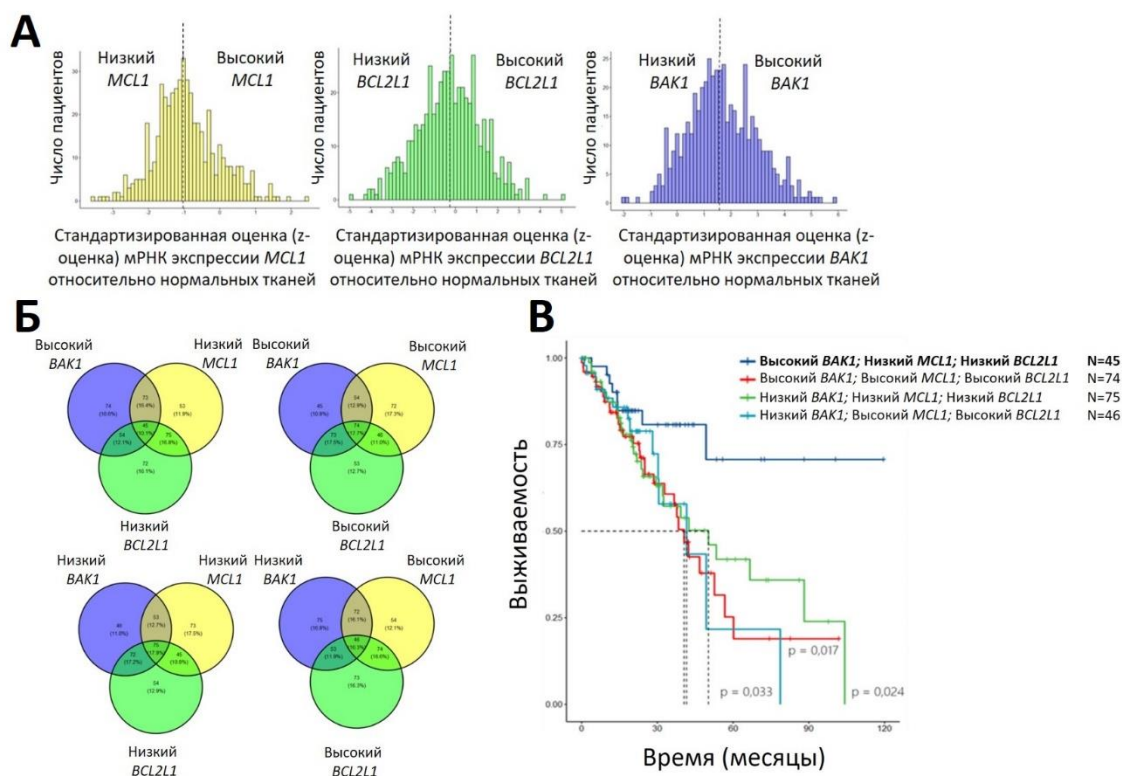


Рис. 27. Оценка роли семейства Bcl-2 в выживаемости пациентов с аденокарциномой легкого. А. Гистограммы стандартизированных оценок (z-оценок) уровней мРНК генов семейства Bcl-2 (*MCL1* кодирует Mcl-1, *BCL2L1* – Bcl-xL, *BAK1* – Bак) в опухолевых тканях относительно

нормальных тканей (log RNA Seq V2 RSEM). Б. Диаграммы Венна показывают формирование четырех подгрупп пациентов для анализа выживаемости: Высокий *BAK1*, Низкий *MCL1*, Низкий *BCL2L1*; Высокий *BAK1*, Высокий *MCL1*, Высокий *BCL2L1*; Низкий *BAK1*, Низкий *MCL1*, Низкий *BCL2L1*; Низкий *BAK1*, Высокий *MCL1*, Высокий *BCL2L1*. В. Кривые Каплана-Мейера выживаемости пациентов в четырех подгруппах с различной экспрессией генов белков семейства Bcl-2. Тест логарифмического ранга с поправкой Холма-Бонферрони был использован для сравнения группы пациентов «Высокий *BAK1*, Низкий *MCL1*, Низкий *BCL2L1*» с другими подгруппами. Пояснения к результатам приведены в соответствующем разделе «Материалы и методы». Опубликовано с модификациями в [248].

Таким образом, профиль экспрессии генов белков семейства Bcl-2 является значимым прогностическим маркером у пациентов с аденокарциномой легкого и может играть важную роль в прогнозировании эффективности противоопухолевой терапии данного вида рака.

3.6. Оценка эффективности совместного использования антагонистов Mcl-1 и MDM2

Как было отмечено, в настоящее время активно изучается противоопухолевая активность ВНЗ-миметиков в различных гематологических и солидных злокачественных образованиях. Ряд соединений проходит клинические испытания, а Венетоклакс в комбинации с различными химиопрепаратами уже одобрен для лечения ОМЛ [12]. Однако в качестве индивидуальных соединений применение ВНЗ-миметиков малоэффективно. Одной из основных причин этого является развитие приобретенной устойчивости к их действию, что было показано в ходе данной работы для антагониста S63845. Для расширения спектра использования и увеличения противоопухолевой активности целесообразно комбинировать препараты этого класса между собой или с другими противораковыми агентами. С этой целью было предложено оценить эффективность сочетания ВНЗ-миметиков с нутлинами, которые относятся к группе низкомолекулярных селективных антагонистов белка MDM2. Как сказано выше, механизм действия нутлинов заключается в ингибировании MDM2, что ведет к накоплению и повышению

транскрипционной активности белка p53 в опухолевых клетках. Кроме того, было обнаружено, что комбинирование антагонистов Bcl-2 (ABT199 – Венетоклакс) и MDM2 (RG7388 – Идасанутлин) приводило к синергетическому эффекту в опухолевой модели нейробластомы *in vitro* и *in vivo* [253]. В настоящее время данное сочетание препаратов исследуется в клинических испытаниях [8,13]. Однако целесообразность совместного ингибирования Mcl-1 и MDM2 в солидных моделях опухолей не была изучена. В настоящей работе анализ эффективности комбинации антагонистов Mcl-1 (S63845) и MDM2 (RG7388 - Идасанутлин) был проведен на модели клеток нейробластомы линий SH-SY5Y и SK-N-SH. Эти клетки содержат белок p53 дикого типа [254], что является необходимым условием для действия нутлинов [8], в то время как ранее использованные в рамках данной работы линии или содержат мутации в гене p53 (H23 [255] и SK-N-Be(2)c [256]), или характеризуются низкой функциональной активностью p53 (HeLa [257]). Кроме того, было показано, что нутлины проявляют высокую противоопухолевую активность в нейробластоме [258].

По итогам предварительных экспериментов при помощи MTS-теста, представляющего собой разновидность МТТ-теста, было определено, что выбранные клеточные линии SH-SY5Y и SK-N-SH обладают низкой чувствительностью к действию S63845: значения ингибирующих концентраций (IC50) составили $18,01 \pm 5,21$ мкМ и $14,97 \pm 4,54$ мкМ соответственно. Однако SH-SY5Y и SK-N-SH обладают высокой чувствительностью к действию RG7388: значения ингибирующих концентраций (IC50) составили $0,27 \pm 0,08$ мкМ и $2,12 \pm 0,62$ мкМ соответственно, что полностью согласуется с ранее полученными данными по ответам этих клеточных линий на ингибирование Mcl-1 и MDM2 [248,253,259,260]. Время инкубации клеток после добавления S63845 или RG7388 составило 24 часа (Рис. 28А, Б).

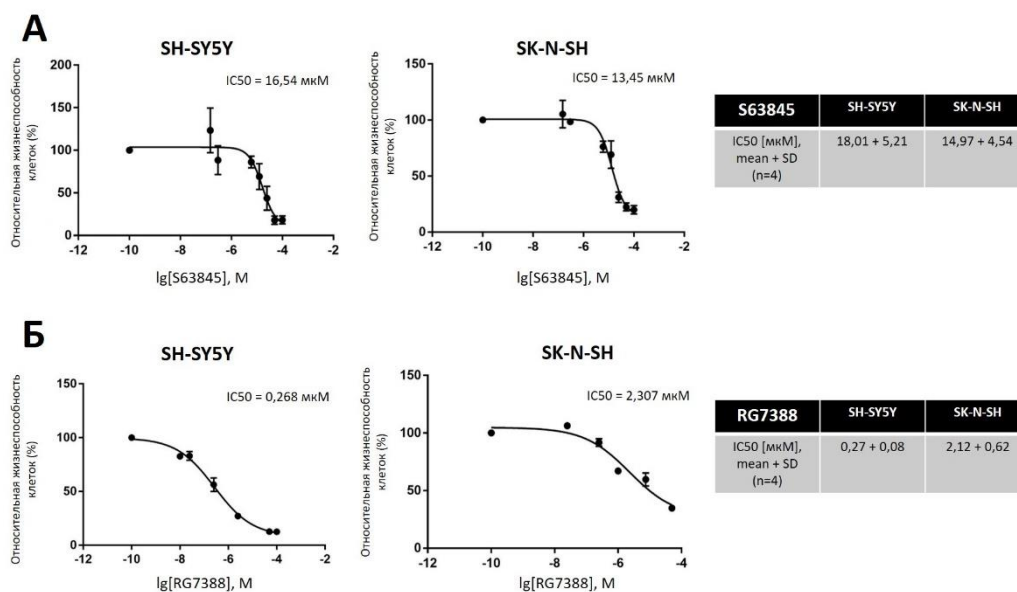


Рис. 28. Оценка жизнеспособности клеток SH-SY5Y и SK-N-SH методом MTS-теста после добавления S63845 (A) или RG7388 (B). Представлены репрезентативные эксперименты и статистический анализ биологических повторов (n=4) в виде среднего (mean) и стандартного отклонения (SD). Время инкубации после добавления соответствующих концентраций ингибиторов составляло 24 часа. Опубликовано с модификациями в [261].

Далее была произведена оценка эффективности совместного применения S63845 и RG7388 в клетках SH-SY5Y и SK-N-SH методами Вестерн-блота и проточной цитометрии. Первоначально были взяты концентрации 1 мкМ для обоих антагонистов (Рис. 29). Время инкубации после добавления ингибиторов – 24 часа. Маркером действия препаратов является накопление белков Mcl-1 и p53 под действием S63845 и RG7388 соответственно. Выявлено, что в обеих клеточных линиях комбинация S63845 (1 мкМ) и RG7388 (1 мкМ) вела к выраженному синергетическому эффекту согласно результатам Вестерн-блот анализа (степень расщепления эффекторной каспазы-3 и PARP) и данным цитометрии. Так, согласно subG1-тесту, размер фракции клеток в фазе subG1 увеличивался с 16,2% до 21,7% и с 7,6% до 19,5% при комбинации препаратов по сравнению с действием RG7388 (1 мкМ) в клетках SH-SY5Y и SK-N-SH соответственно. S63845 в дозе 1 мкМ не приводил к запуску клеточной гибели в выбранных клеточных линиях (Рис. 29А-Г).

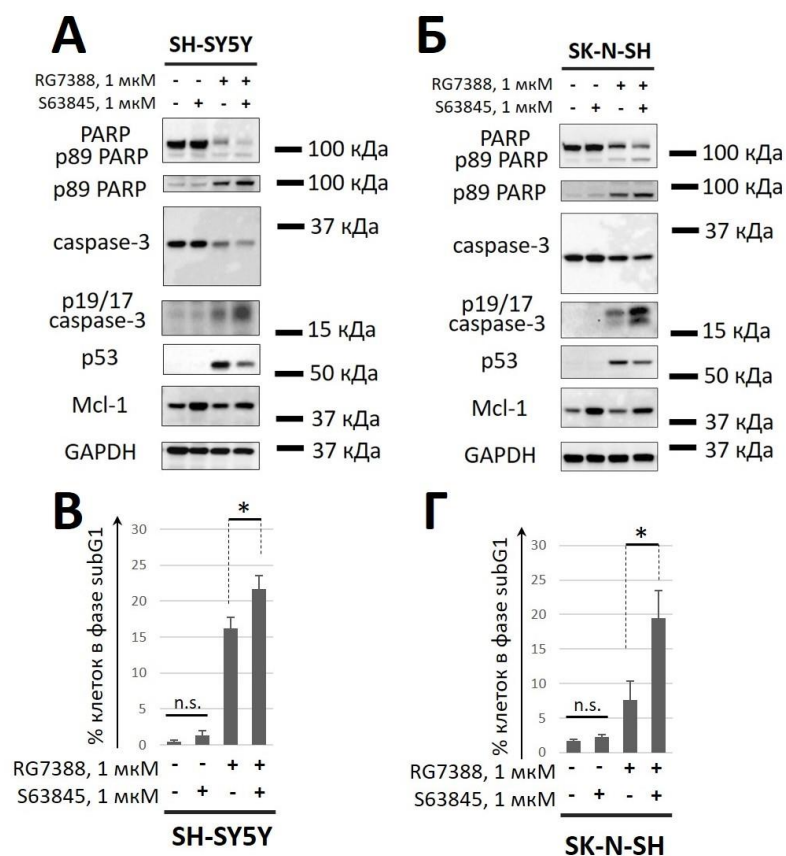


Рис. 29. Оценка эффективности применения антагонистов Mcl-1 (S63845, 1 мкМ) и MDM2 (RG7388, 1 мкМ) в модели нейробластомы. А-Б. Результаты Вестерн-блот анализа в клетках SH-SY5Y (А) и SK-N-SH (Б). Г-Д. Данные цитометрического анализа методом subG1 в клетках SH-SY5Y (В) и SK-N-SH (Г). PARP – полноразмерная форма белка (116 кДа, сверху) и p89 – фрагмент белка PARP (89 кДа, снизу); p19/17 caspase-3 – каталитически активные фрагменты эффекторной каспазы-3. Белок GAPDH был использован как контроль загрузки геля. Время инкубации клеток после добавления ингибиторов составляет 24 часа. Данные на гистограммах представлены как среднее ± стандартное отклонение, n=4; n.s. – статистически не значимо, * p<0,05 (U-тест). Опубликовано с модификациями в [261].

Далее были снижены дозы антагониста Mcl-1 до 100 нМ и был проведен анализ клеточной гибели аналогичным образом (Рис. 30). Обнаружено, что S63845, начиная с 100 нМ, приводил к значительному усилению апоптоза, запускаемого при добавлении RG7388 (Идасанутлина), согласно результатам двух независимых методов. Так, например, 100 нМ S63845 + 1 мкМ RG7388 вели к увеличению

количества клеток в фазе subG1 по сравнению с RG7388 (1 мкМ) с 19,2% до 26,8% и с 7,5% до 19% в клетках SH-SY5Y и SK-N-SH (Рис. 30А-Г).

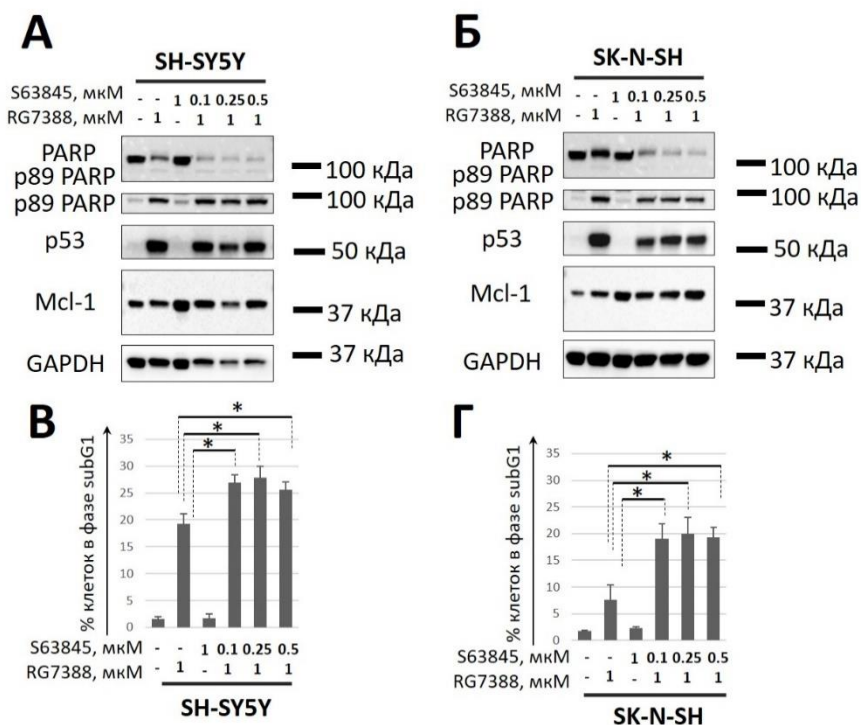


Рис. 30. Оценка эффективности применения антагонистов Mcl-1 (S63845, 100-500 нМ) и MDM2 (RG7388, 1 мкМ) в модели нейробластомы. А-Б. Результаты Вестерн-блот анализа в клетках SH-SY5Y (А) и SK-N-SH (Б). Г-Д. Данные цитометрического анализа методом subG1 в клетках SH-SY5Y (В) и SK-N-SH (Г). PARP – полноразмерная форма белка (116 кДа, сверху) и p89 – фрагмент белка PARP (89 кДа, снизу). Белок GAPDH был использован как контроль загрузки геля. Время инкубации клеток после добавления ингибиторов составляет 24 часа. Данные на гистограммах представлены как среднее \pm стандартное отклонение, n=4; * p<0,05 (U-тест). Опубликовано с модификациями в [261].

На следующем этапе была оценена клеточная гибель при использовании наномолярных концентраций ингибиторов Mcl-1 и MDM2. Время инкубации после добавления антагонистов составило 24 часа (Рис. 31). По данным Вестерн-блота, в двух клеточных линиях наблюдалось значимое усиление гибели при совместном использовании S63845 и RG7388 по сравнению с действием последнего в качестве индивидуального вещества, уже начиная с 100 нМ, о чем свидетельствует расщепление полной формы каспазы-3 и PARP, а также накопление каталитически

активных фрагментов эффекторной каспазы-3 p19/17 и фрагмента p89 PARP (Рис. 31А, Б). Результаты Вестерн-блота подтверждаются данными цитометрического анализа. Так, в линии клеток SH-SY5Y происходило увеличение количества клеток в фазе subG1 с 5,6% до 12,2%, с 8,4% до 16,1% и с 12,1% до 22,5% в концентрациях 100 нМ, 250 нМ и 500 нМ S63845 + RG7388 по сравнению с аналогичной дозой RG7388. Схожие результаты наблюдались в линии клеток SK-N-SH (Рис. 31В, Г).

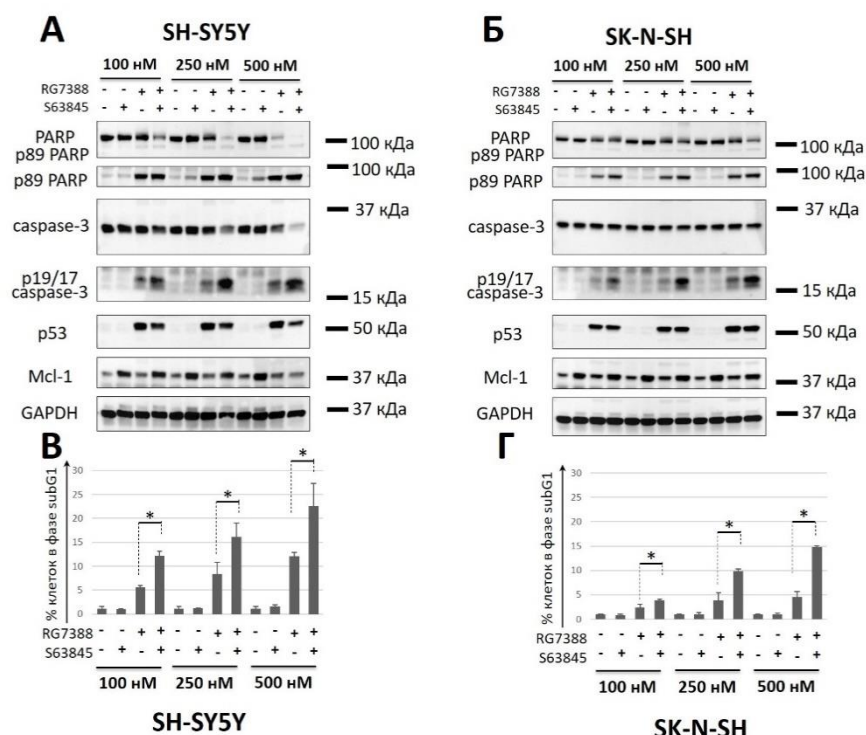


Рис. 31. Оценка эффективности применения антагонистов Mcl-1 (S63845) и MDM2 (RG7388) в наномолярном диапазоне концентраций (100-500 нМ) в модели нейробластомы. А-Б. Результаты Вестерн-блот анализа в клетках SH-SY5Y (А) и SK-N-SH (Б). **Г-Д.** Данные цитометрического анализа методом subG1 в клетках SH-SY5Y (В) и SK-N-SH (Г). PARP – полноразмерная форма белка (116 кДа, сверху) и p89 – фрагмент белка PARP (89 кДа, снизу); p19/17 caspase-3 – каталитически активные фрагменты эффекторной каспазы-3. Белок GAPDH был использован как контроль загрузки геля. Время инкубации клеток после добавления ингибиторов составляет 24 часа. Данные на гистограммах представлены как среднее ± стандартное отклонение, n=4; * p<0,05 (U-тест). Опубликовано с модификациями в [261].

Таким образом, полученные данные наглядно свидетельствуют о выраженном синергетическом эффекте при комбинировании ВНЗ-миметика S63845 и

RG7388), в которой выжившие клетки росли 4 дня. Затем проводили пересадку клеток и цикл повторяли заново. После 3 циклов с концентрацией 125 нМ концентрация RG7388 была увеличена до 250 нМ, что равно значению IC50 для клеток SH-SY5Y. В этих условиях клетки находились также в течение 3 циклов. Стоит отметить, что в отличие от ингибитора Mcl-1, к раковым клеткам не добавлялся Верапамил, так как было ранее показано, что нутлины сами по себе подавляют активность Р-гликопротеинов [263].

Далее был проведен предварительный анализ на наличие устойчивости клеточной линии SH-SY5Y к RG7388 с помощью MTS-теста. Время инкубации клеток с веществом составляло 24 часа. Обнаружено, что в клетках SH-SY5Y, уст. к RG7388, значение IC50 выросло более чем в 5 раз относительно исходных клеток SH-SY5Y: $1,59 \pm 0,68$ мкМ и $0,27 \pm 0,08$ мкМ соответственно (Рис. 34).

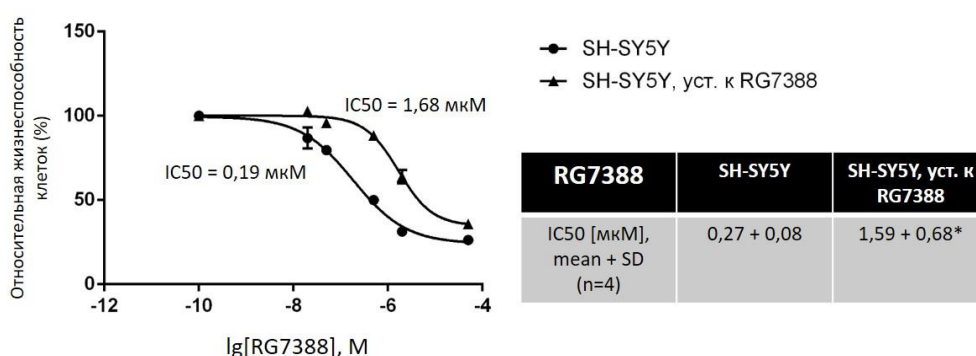


Рис. 34. Оценка жизнеспособности клеток SH-SY5Y и SH-SY5Y, уст. к RG7388, методом MTS-теста после добавления RG7388. Представлен репрезентативный эксперимент и статистический анализ биологических повторов (n=4) MTS-теста в виде среднего (mean) и стандартного отклонения (SD), n=4; * p<0,05 (U-тест). Время инкубации после добавления соответствующих концентраций ингибитора составляло 24 часа. Опубликовано с модификациями в [261].

Для дальнейшего исследования была выбрана концентрация 1 мкМ RG7388 (время инкубации – 24 часа) и была проведена оценка клеточной гибели в исходных и устойчивых клетках SH-SY5Y методами Вестерн-блот анализа и проточной цитометрии. Установлено, что при данной концентрации RG7388 клетки SH-SY5Y,

уст. к RG7388, обладали существенно меньшей чувствительностью к действию ингибитора MDM2 по сравнению с исходным пулом клеток, что наглядно показывает степень расщепления апоптотических маркеров и уровень накопления фрагментов p19/17 эффекторной каспазы-3 и p89 PARP (Рис. 33А). Данные Вестерн-блота подтверждаются результатами цитометрического анализа subG1-тестом. Так, число клеток в стадии subG1 уменьшалось с 20,1% в SH-SY5Y до 6% в SH-SY5Y, уст. к RG7388 (Рис. 35Б).

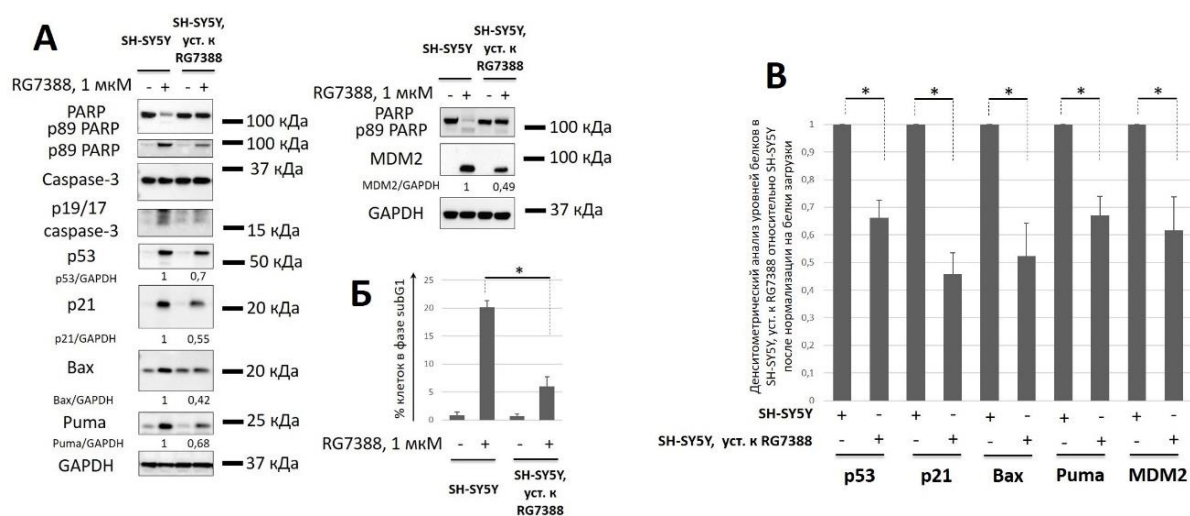


Рис. 35. Сравнительный анализ клеточной гибели при действии RG7388 и уровни MDM2, p53 и p53-активируемых белков (p21, Bax, Puma) в клетках SH-SY5Y и SH-SY5Y, уст. к RG7388. Результаты Вестерн-блот анализа (А), проточной цитометрии методом subG1 (Б) и денситометрического анализа (В) в клетках в клетках SH-SY5Y и SH-SY5Y, уст. к RG7388. PARP и p89 PARP – полноразмерная форма белка и его расщепленный фрагмент соответственно, p19/17 caspase-3 – каталитически активные фрагменты эффекторной каспазы-3; p53/GAPDH, p21/GAPDH, Bax/GAPDH, Puma/GAPDH и MDM2/GAPDH – денситометрический анализ уровней соответствующих белков после добавления ингибитора MDM2 в пересчете на GAPDH, который был использован в качестве контроля загрузки геля; время инкубации клеток после добавления RG7388 (1 мкМ) – 24 часа. Данные на гистограммах представлены как среднее ± стандартное отклонение, n=4; * p<0,05 (U-тест). Опубликовано с модификациями в [261].

Кроме того, при помощи Вестерн-блота было обнаружено, что в устойчивых клетках относительно исходных при добавлении RG7388 в 1,5-2 раза уменьшается накопление MDM2, p53 и p53-активируемых белков, таких как p21, Bax, Puma, что

статистически значимо воспроизводилось в других экспериментах (Рис. 35А, В). Данное обстоятельство указывает на возможное нарушение транскрипционной активности белка p53, что может быть обусловлено появлением мутаций в его структуре.

Для проверки этого предположения был проведен анализ экспрессии мРНК генов соответствующих белков методом ПЦР в реальном времени, ибо p53 является активатором транскрипции различных генов, в том числе *CDKN1A* (кодирует p21), *BAX* (Bax), *BBC3* (Puma) и *MDM2* (MDM2). Установлено, что для всех 4 генов наблюдалось уменьшение уровня мРНК в клетках SH-SY5Y, уст. к RG7388, по сравнению с клетками SH-SY5Y после добавления RG7388 (1 мкМ). Время инкубации клеток с ингибитором MDM2 перед выделением РНК составляло 24 часа (Рис. 36).

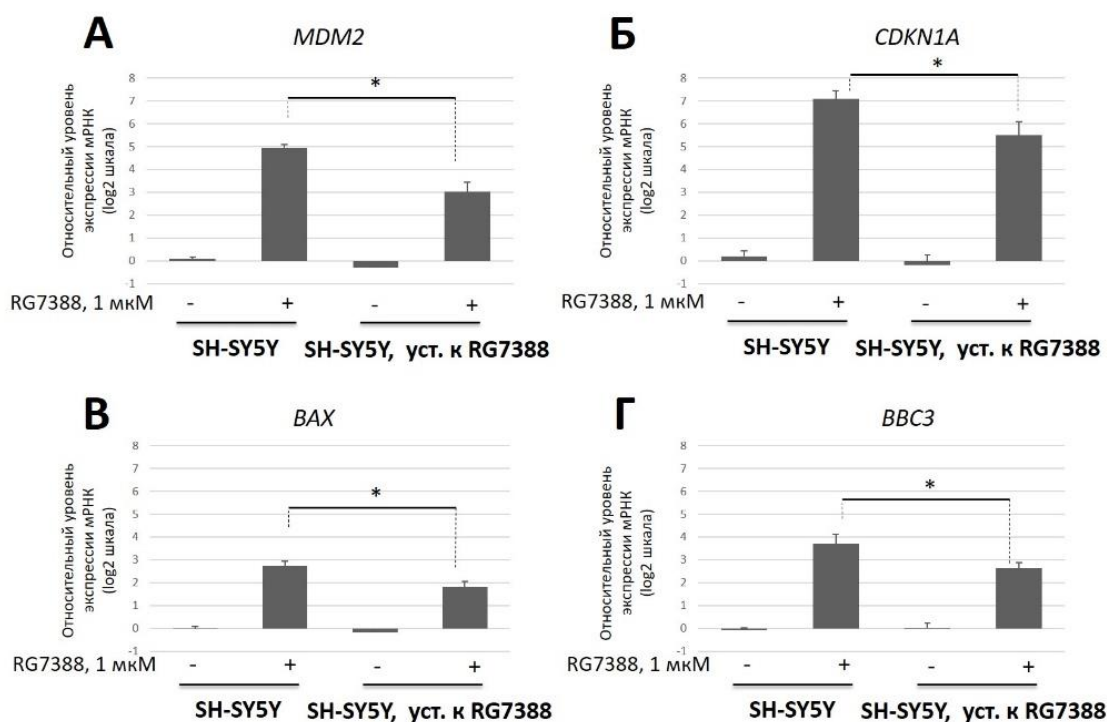


Рис. 36. Оценка уровня мРНК экспрессии генов *MDM2*, *CDKN1A*, *BAX*, *BBC3* при действии RG7388 (1 мкМ) в клетках SH-SY5Y и SH-SY5Y, уст. к RG7388. Данные на гистограммах представлены как среднее \pm стандартное отклонение после логарифмирования по основанию 2, $n=3$; двусторонний t-критерий Стьюдента с поправкой Уэлча; * $p < 0,05$ (U-тест). Пояснения к

результатам приведены в соответствующем разделе «Материалы и методы» и указаны в тексте. Опубликовано с модификациями в [261].

Таким образом, результаты, полученные методом ПЦР, согласуются с данными Вестерн-блот анализа и свидетельствуют об уменьшении активации транскрипции генов p53-зависимых белков в устойчивых к RG7388 клетках SH-SY5Y при индукции этим агентом по сравнению с исходной популяцией клеток, что с учетом снижения накопления белка p53 в аналогичных условиях подтверждает появление в его структуре возможных мутаций, и, как следствие, низкую функциональную активность в устойчивых к RG7388 клетках SH-SY5Y.

3.8. Обнаружение мутаций в гене TP53 в опухолевых клетках с повышенной устойчивостью к RG7388 и их биоинформатический анализ

Как уже было отмечено, возможной причиной развития приобретенной устойчивости к антагонисту MDM2 RG7388 в опухолевых клетках является появление мутаций в структуре гена TP53, кодирующего белок p53, о чем свидетельствует ряд работ [16,244]. Сниженная транскрипция p53-зависимых генов в совокупности с уменьшенным накоплением белка p53 после добавления RG7388 в клетках SH-SY5Y, уст. к RG7388, обнаруженные в ходе данной работы, подтверждают это предположение. Для прямого подтверждения полученных данных был применен метод секвенирования нового поколения (NGS), выполненный на приборе HiSeq1500 (Illumina) (Рис. 37).

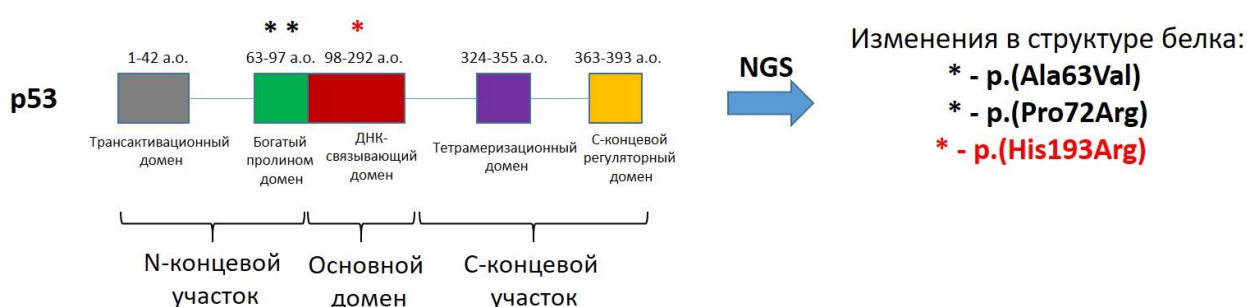


Рис. 37. Схема доменной структуры белка p53 с локализацией обнаруженных замен аминокислотных остатков в клетках SH-SY5Y с повышенной устойчивостью к действию RG7388 методом NGS. * отмечены мутации в гене TP53, приведшие к изменениям структуры

белка p53. NGS – метод секвенирования нового поколения; а.о. – аминокислотный остаток. Опубликовано с модификациями в [261].

По его итогам были обнаружены 3 точечные мутации, приведшие к заменам аминокислотных остатков в различных доменах белка p53. Как уже было отмечено, белок p53 состоит из 393 аминокислотных остатков и обладает 5 доменами [264]. Две мутации располагались в богатом пролином домене: Ala63Val и Pro72Arg. Третья, His193Arg находилась в ДНК-связывающем домене (Рис. 37). Стоит отметить, что мутация Pro72Arg была детектирована как в исходных клетках SH-SY5Y, так и в SH-SY5Y, уст. к RG7388, в то время как две другие были выявлены только в клетках с приобретенной устойчивостью к RG7388.

Для прогнозирования влияния обнаруженных мутаций на структурную организацию и функциональную активность белка p53 был осуществлен биоинформатический анализ, основанный на молекулярном моделировании за счет пакета Amber и суперкомпьютерных мощностей¹. Согласно его результатам, мутации в богатом пролином домене не оказывают влияния на структуру p53 и его активность в качестве транскрипционного фактора. Интересно, что замена Pro72Arg является примером генетического полиморфизма гена *TP53*. Показано, что наличие этого типа полиморфизма коррелирует с предрасположенностью к развитию ряда злокачественных новообразований [265,266].

По данным молекулярного моделирования, замена гистидина на аргинин в 193 положении приводила к конформационному изменению петли, образованной 182-194 а.о. (Рис. 38А), что вело к перестройке структурной организации мутантного белка p53 по сравнению с белком дикого типа (Рис. 38Б).

¹ Исследование было выполнено совместно с к.х.н., в.н.с. НИИ ФХБ им. А. Н. Белозерского МГУ им. М. В. Ломоносова Ниловым Д.К.

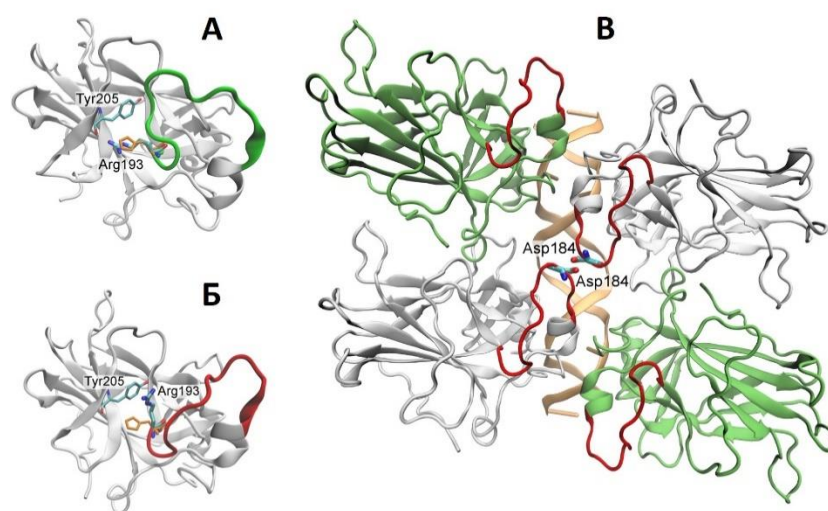


Рис. 38. Молекулярное моделирование структурной организации белка p53 с мутацией His193Arg. А. Исходная структура мутантного белка. Петля, состоящая из 182–194 а.о., показана зеленым цветом. Б. Структура белка после конформационного изменения. Петля, состоящая из 182–194 а.о., показана красным. Координаты His193 в белке дикого типа показаны оранжевым цветом. Атомы водорода опущены для ясности. В. Структура мутанта His193Arg, показанная белым или салатным цветом, была наложена на субъединицы p53 дикого типа тетрамерного комплекса p53-ДНК (PDB ID 5mg7; ДНК из структуры 5mg7 показана оранжевым цветом). Остатки петли, состоящей из 182–194 а.о., показаны красным. Опубликовано с модификациями в [261].

Важно отметить, что белок p53 дикого типа связывает ДНК в виде тетрамера с высокой степенью взаимодействия. Положительная кооперативность основана на стабилизации сборки p53 за счет взаимодействий между мономерами, в то время как Glu180 и Arg181 являются ключевыми аминокислотными остатками, которые опосредуют взаимное электростатическое взаимодействие между основными доменами p53 [267,268]. При этом петля, содержащая мутацию His193Arg, несмотря на нахождение в ДНК-связывающем домене, напрямую не участвует в связывании тетрамерного комплекса p53 с ДНК. Однако из-за изменения конформации петли два соседних белка p53 могут образовывать неблагоприятные межмолекулярные контакты (в частности, между двумя отрицательно заряженными остатками аспартата), препятствуя тем самым эффективной тетрамеризации (Рис. 38В).

Таким образом, данные молекулярного моделирования демонстрируют, что замена His193Arg, вероятно, является «кооперативной» и дестабилизирует тетрамерный комплекс p53-ДНК из-за необычного конформационного состояния петли, образованной 182–194 а.о., влияя тем самым на транскрипционную активность p53.

Наконец, был проведен анализ встречаемости мутации His193Arg в различных типах опухолей. Данные были взяты из открытого ресурса *TP53 Database* версия R20 (<https://tp53.cancer.gov>) [269]. Согласно полученным результатам, был обнаружен 101 случай появления мутации His193Arg в структуре белка p53 у онкологических пациентов. Наиболее часто она встречалась в опухолевых тканях яичников (n=18), молочной железы (n=13), легкого (n=12), пищевода (n=11), головы и шеи (n=11) (Рис. 39).

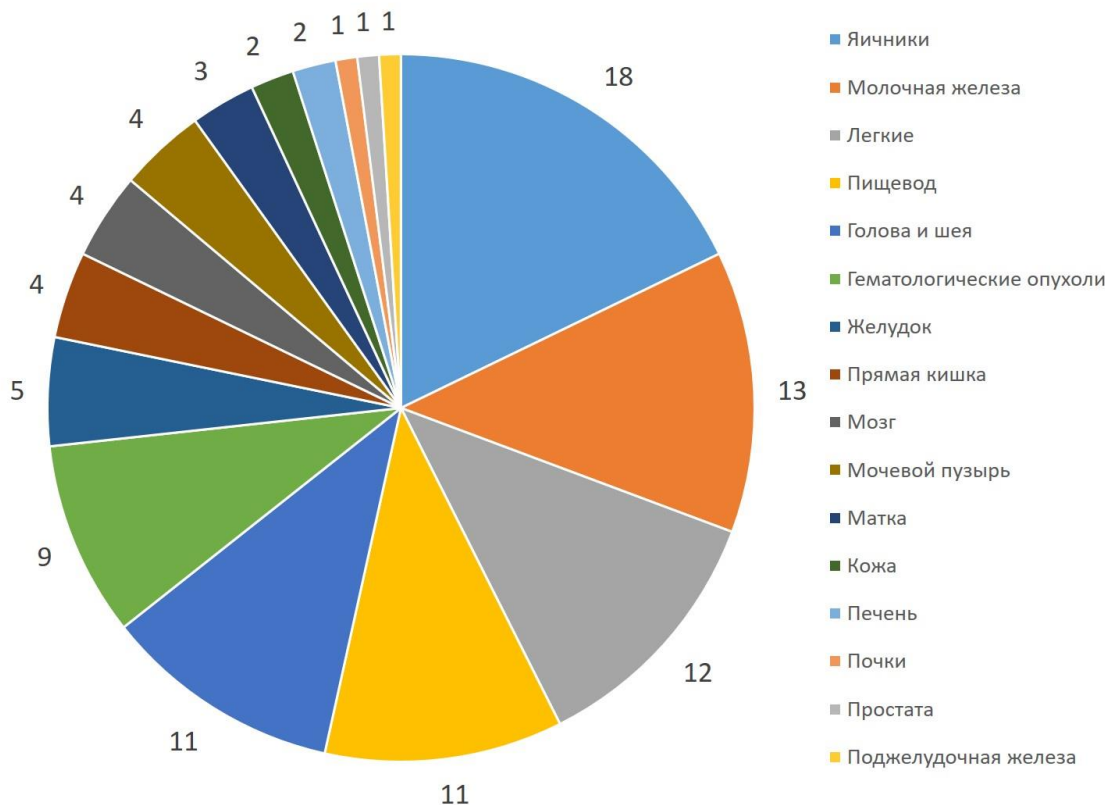


Рис. 39. Анализ встречаемости мутации His193Arg в опухолевых тканях пациентов (n=101). Круговая диаграмма отображает типы опухолей и число случаев обнаружения мутации по данным открытой базы данных (<https://tp53.cancer.gov>). Опубликовано с модификациями в [261].

Таким образом, появление мутации His193Arg в структуре белка p53, детектируемой в различных типах опухолей, является наиболее вероятной причиной развития приобретенной устойчивости опухолевых клеток SH-SY5Y к действию антагониста MDM2 RG7388.

3.9. Оценка эффективности применения антагониста Mcl-1 S63845 и химиопрепаратов (Цисплатина и Доксорубицина) для преодоления устойчивости опухолевых клеток к действию RG7388

Рациональной стратегией преодоления приобретенной устойчивости опухолевых клеток к различным препаратам является комбинирование последних с другими противораковыми агентами. В настоящей работе была оценена целесообразность использования ВНЗ-миметика Mcl-1 S63845, а также традиционных химиотерапевтических средств (ДНК-повреждающих агентов – Цисплатина и Доксорубицина) в сочетании с RG7388 для преодоления устойчивости клеток нейробластомы SH-SY5Y к RG7388.

В ходе выполнения данного исследования был показан выраженный синергетический эффект при совместном применении ингибиторов S63845 и RG7388 в клетках SH-SY5Y. Поэтому первоначально была оценена клеточная гибель, запускаемая при добавлении S63845 (1 мкМ) и RG7388 (1 мкМ), в исходных и устойчивых к RG7388 клетках SH-SY5Y, методами Вестерн-блот анализа и проточной цитометрии. Время инкубации с клетками после добавления соответствующих доз антагонистов составляло 24 часа (Рис. 40). Согласно данным Вестерн-блота, S63845 усиливал RG7388-опосредованную гибель клеток, о чем свидетельствует степень расщепления белков каспазы-3 и PARP в клетках SH-SY5Y, уст. к RG7388. Однако комбинация двух ингибиторов вела к существенно менее выраженному запуску апоптоза в устойчивых клетках по сравнению с исходной популяцией SH-SY5Y (Рис. 40А). Схожая картина наблюдалась по итогам проведения subG1-теста: размер популяции subG1 увеличивался с 4,3% при действии RG7388 (1 мкМ) до 12,6% S63845+RG7388 (оба – 1 мкМ) в клетках SH-

SY5Y, уст. к RG7388, при этом в исходных клетках SH-SY5Y размер фракции subG1 при S63845+RG7388 был существенно выше – 21,7% (Рис. 40Б).

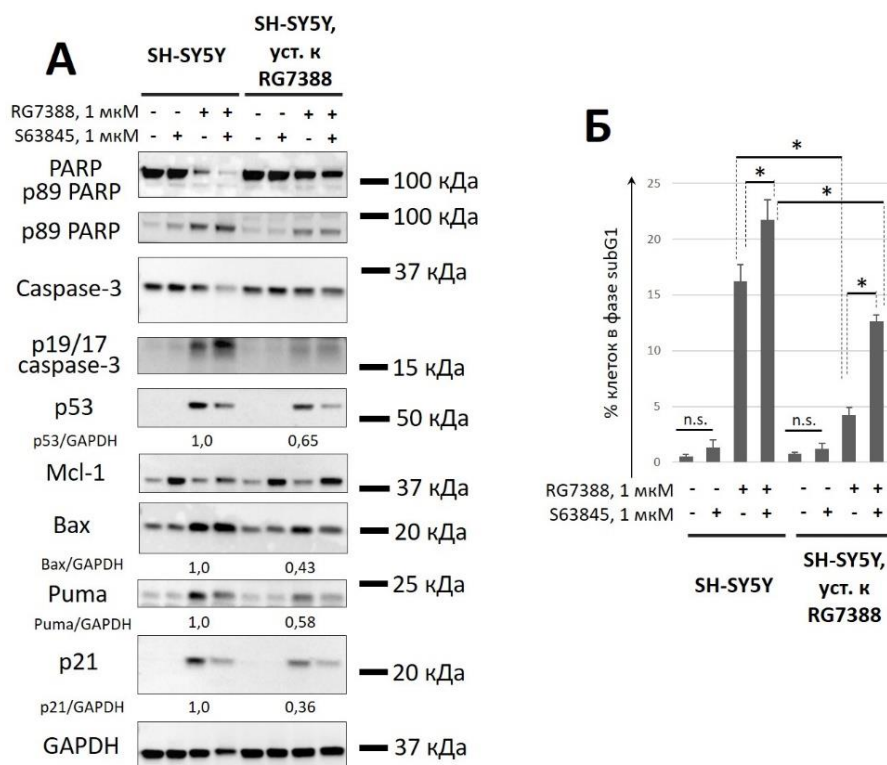


Рис. 40. Оценка эффективности применения ингибитора Mcl-1 (S63845) для преодоления устойчивости клеток к RG7388. Результаты Вестерн-блот анализа (А) и данные цитометрического анализа методом subG1 (Б) в клетках SH-SY5Y и SH-SY5Y, уст. к RG7388. PARP – полноразмерная форма белка (116 кДа, сверху) и p89 – фрагмент белка PARP (89 кДа, снизу); p19/17 caspase-3 – каталитически активные фрагменты эффекторной каспазы-3; p53/GAPDH и p21/GAPDH – денситометрический анализ уровней соответствующих белков после добавления ингибитора MDM2 в пересчете на GAPDH, который был использован в качестве контроля загрузки геля. Время инкубации клеток после добавления ингибиторов составляет 24 часа. Данные на гистограмме представлены как среднее ± стандартное отклонение, n=4; n.s. – статистически не значимо, * p<0,05 (U-тест). Опубликовано с модификациями в [261].

Таким образом, по результатам использования двух независимых методов, было установлено, что ингибирование Mcl-1 при помощи S63845 в сочетании с RG7388 усиливало противоопухолевую активность последнего, однако не приводило к полному преодолению устойчивости клеток SH-SY5Y к действию RG7388.

Другим потенциальным способом преодоления устойчивости к RG7388 может быть применение Цисплатина и Доксорубина – химиотерапевтических препаратов, используемых при лечении нейробластомы [270]. Время инкубации с клетками после добавления соответствующих доз препаратов составляло 24 часа.

При помощи MTS-теста было выявлено, что клетки SH-SY5Y, уст. к RG7388, обладают меньшей чувствительностью к Цисплатину в качестве индивидуального соединения: значение IC₅₀ увеличилось в 1,5 раза по сравнению с исходными клетками SH-SY5Y – 13,0 и 7,95 мкМ соответственно (Рис. 41А). По данным Вестерн-блот анализа, Цисплатин (25 мкМ) усиливал клеточную гибель, запускаемую при действии RG7388 (1 мкМ) как в исходных, так и в устойчивых к RG7388 клетках SH-SY5Y. Однако в последних комбинация Цисплатина и RG7388 приводила к менее эффективному запуску апоптоза, что наглядно показывает степень расщепления белков каспазы-3 и PARP (Рис. 41Б). Данные цитометрического анализа подтверждают результаты Вестерн-блота. Так, при действии Цисплатина в качестве индивидуального агента размер популяции клеток в фазе subG1 составлял 15,4% и 6,9%, в то время как в комбинации с RG7388 – 26,2% и 20,8% в клетках SH-SY5Y и SH-SY5Y, уст. к RG7388, соответственно (Рис. 41В).

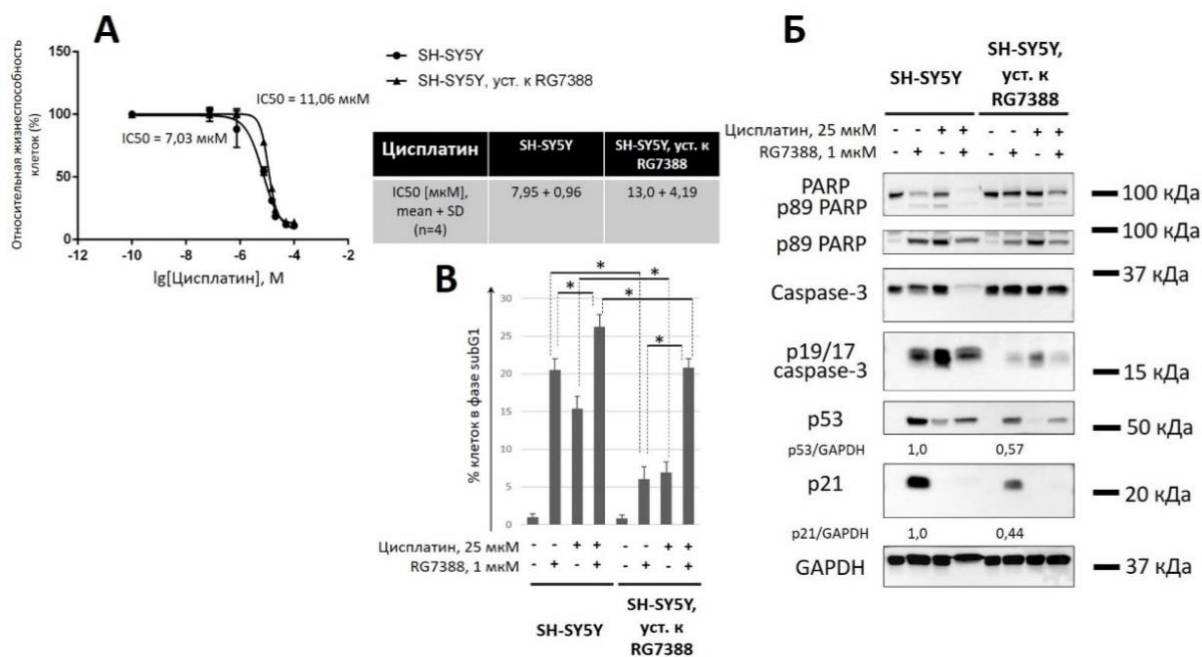


Рис. 41. Оценка эффективности применения химиопрепарата Цисплатина для преодоления устойчивости клеток к RG7388. Результаты MTS-теста (А), Вестерн-блот анализа (Б) и данные цитометрического анализа методом subG1 (В) в клетках SH-SY5Y и SH-SY5Y, уст. к RG7388. Для MTS-теста представлен репрезентативный эксперимент и статистический анализ биологических повторов (n=4) в виде среднего (mean) и стандартного отклонения (SD). PARP – полноразмерная форма белка (116 кДа, сверху) и p89 – фрагмент белка PARP (89 кДа, снизу); p19/17 caspase-3 – каталитически активные фрагменты эффекторной каспазы-3; p53/GAPDH и p21/GAPDH – денситометрический анализ уровней соответствующих белков после добавления ингибитора MDM2 в пересчете на GAPDH, который был использован в качестве контроля загрузки геля. Время инкубации клеток после добавления препаратов составляет 24 часа. Данные на гистограмме представлены как среднее ± стандартное отклонение, n=4; * p<0,05 (U-тест). Опубликовано с модификациями в [261].

Схожие закономерности наблюдались в случае использования другого химиотерапевтического препарата – Доксорубицина (Рис. 42). По данным MTS-теста было обнаружено, что клетки SH-SY5Y, уст. к RG7388, обладают меньшей чувствительностью к Доксорубицину в качестве индивидуального вещества: значение IC50 увеличилось в несколько раз по сравнению с исходными клетками SH-SY5Y – 0,23 и 0,78 мкМ соответственно (Рис. 42А). В ходе Вестерн-блот анализа было показано, что Доксорубицин (1 мкМ) усиливал клеточную гибель,

запускаемую при действии RG7388 (1 мкМ) в исходных клетках SH-SY5Y, но лишь незначительно увеличивал гибель клеток, устойчивых к RG7388, что демонстрирует степень расщепления белков каспазы-3 и PARP (Рис. 42Б). Эти результаты подтверждаются данными цитометрического анализа. Так, при действии Доксорубина в качестве индивидуального агента число клеток в фазе subG1 составляло 21,2% и 7,2%, в то время как в комбинации с RG7388 – 28,9% и 11,6% в клетках SH-SY5Y и SH-SY5Y, уст. к RG7388 соответственно (Рис. 42В).

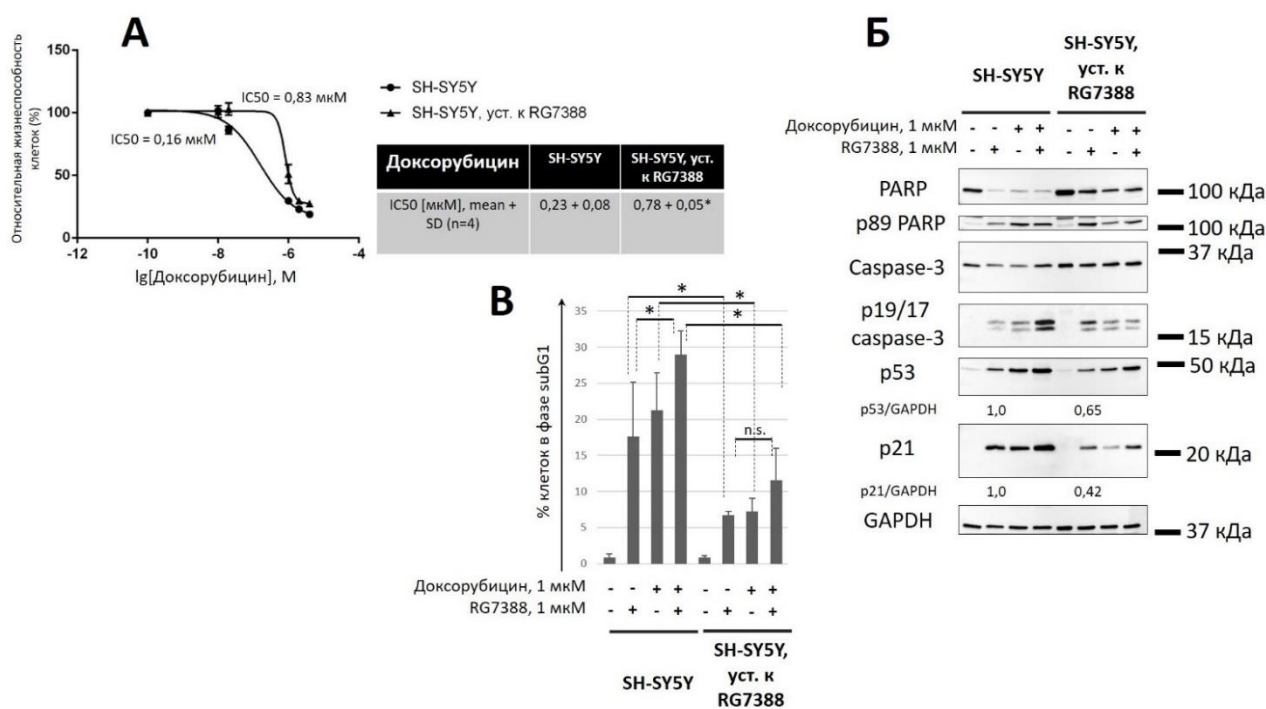


Рис. 42. Оценка эффективности применения химиопрепарата Доксорубина для преодоления устойчивости клеток к RG7388. Результаты MTS-теста (А), Вестерн-блот анализа (Б) и данные цитометрического анализа методом subG1 (В) в клетках SH-SY5Y и SH-SY5Y, уст. к RG7388. Для MTS-теста представлен репрезентативный эксперимент и статистический анализ биологических повторов (n=4) в виде среднего (mean) и стандартного отклонения (SD). PARP – полноразмерная форма белка (116 кДа, сверху) и p89 – фрагмент белка PARP (89 кДа, снизу). p53/GAPDH и p21/GAPDH – денситометрический анализ уровней соответствующих белков после добавления ингибитора MDM2 в пересчете на GAPDH, который был использован в качестве контроля загрузки геля. Время инкубации клеток после добавления препаратов составляет 24 часа. Данные на гистограмме представлены как среднее ± стандартное отклонение, n=4; * p<0,05 (U-тест). Опубликовано с модификациями в [261].

Таким образом, только Цисплатин и антагонист Mcl-1 S63845 в сочетании с RG7388 приводили к частичному преодолению устойчивости клеток SH-SY5Y к действию RG7388. Кроме того, клетки SH-SY5Y, уст. к RG7388, проявляли меньшую чувствительность к действию Цисплатина и Доксорубина в качестве индивидуальных веществ. Полученные результаты имеют большую значимость для потенциального применения нутлинов в клинике. Несмотря на высокую противоопухолевую активность соединений данной группы, их использование в клинической практике может быть ограниченным ввиду быстрого развития приобретенной устойчивости, которая будет опосредована появлением мутаций в белке p53. Мутантные клоны, благодаря своей повышенной пролиферации и метаболической активности, смогут активно делиться и обеспечивать быстрое увеличение объема опухоли. В то же время их пониженная чувствительность к химиопрепаратам может вести к уменьшению эффективности противоопухолевой терапии и ухудшить выживаемость пациентов. Поэтому рациональнее использовать нутлины в низких дозах и в комбинации с другими противоопухолевыми препаратами для избежания развития неблагоприятной клинической картины, представленной выше.

3.10. Оценка эффективности применения Доксорубина для преодоления устойчивости клеток SH-SY5Y к RG7388 в *in vivo* модели

Для подтверждения данных по снижению чувствительности клеток SH-SY5Y, уст. к RG7388, к химиопрепаратам (на примере Доксорубина) была использована ксенотрасплантантная модель нейробластомы с участием иммунодефицитных мышей NSG. После достижения объема опухоли 50 мм³ (на 5 день после подсадки клеток) были сформированы 4 экспериментальные группы животных: SH-SY5Y («Контроль»), SH-SY5Y («Доксорубин»), SH-SY5Y, уст. к RG7388, («Контроль»), SH-SY5Y, уст. к RG7388 («Доксорубин»). Каждая группа содержала по 5 лабораторных животных. В течение трех дней подряд (с 5 по 7 день) мышам вводили внутривенно 3 мг/кг/день Доксорубина после растворения в

буфере PBS или соответствующий объем физиологического раствора (0,9% хлорида натрия). Дозировка и продолжительность введения Доксорубина были выбраны с учетом его побочных свойств, в частности, выраженной кардиотоксичности у иммунодефицитных мышей [271]. Спустя 12 дней после введения клеток мыши были подвергнуты эвтаназии при помощи углекислого газа².

Было установлено, что клетки SH-SY5Y, уст. к RG7388, в ксенотрансплантантной мышинной модели обладали пониженной чувствительностью к Доксорубину, о чем свидетельствует скорость опухолевого роста по сравнению с клетками SH-SY5Y (Рис. 43А). Выявлено, что введение Доксорубина приводило к уменьшению опухолевого роста по сравнению с контрольными группами как для исходных, так и для мутантных клонов, однако наблюдалась существенная разница в объеме опухолевой ткани между группами SH-SY5Y, уст. к RG7388, («Доксорубин») и SH-SY5Y («Доксорубин»). Статистических различий между двумя контрольными группами не было выявлено (Рис. 43Б).

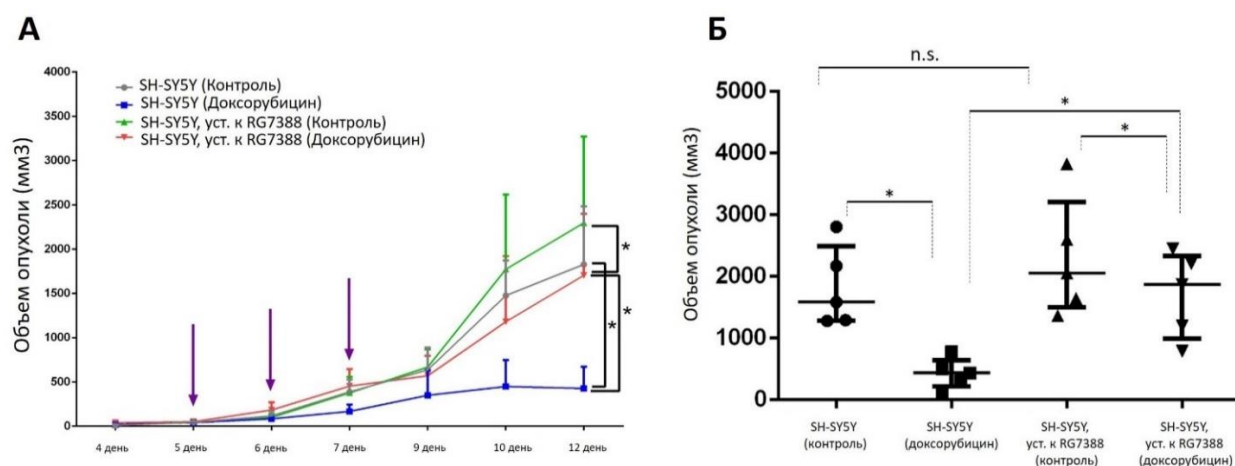


Рис. 43. Анализ эффективности использования Доксорубина для преодоления устойчивости клеток SH-SY5Y к RG7388 в *in vivo* модели. А. Динамика опухолевого роста (мм³) в мышинной ксенотрансплантантной модели нейробластомы в интервале 4-12 дней. Данные

² Исследование было выполнено совместно с к.б.н., с.н.с. ИБХ РАН Шипуновой В. О.

на графике представлены как среднее \pm стандартное отклонение, $n=5$. Б. Объем опухоли (мм^3) на 12 день. Данные на гистограмме представлены как медиана и квартили (25% и 75%), $n=5$, n.s. – статистически не значимо, * $p<0,05$ (U-тест). Опубликовано с модификациями в [261].

Таким образом, полученные различия в ответе на Доксорубин в *in vivo* модели подтверждают ранее представленные в рамках данного исследования результаты *in vitro* экспериментов, свидетельствуя о том, что развитие приобретенной устойчивости к ингибированию MDM2 сопровождается снижением чувствительности к действию ДНК-повреждающих агентов, что имеет большое значение в контексте возможного применения этих препаратов в противоопухолевой терапии.

3.11. Оценка метаболизма и пролиферативной активности опухолевых клеток с повышенной устойчивостью к RG7388 в моделях *in vitro* и *in vivo*

Также был проведен сравнительный анализ пролиферативной активности³ исходных и устойчивых к ингибированию MDM2 клеток нейробластомы в *in vivo* модели (Рис. 44). С этой целью были сформированы две дополнительные экспериментальные группы животных: SH-SY5Y (контроль, $N=4$) и SH-SY5Y, уст. к RG7388, (контроль, $N=6$), которые по условиям получения и экспериментальным манипуляциям были идентичны двум ранее описанным контрольным группам. Оценка пролиферации была осуществлена гистологическими (оценка клеточного обновления) и иммуногистохимическими методами (уровень маркера Ki-67).

³ Исследование было выполнено совместно с к.б.н., врачом-патологоанатомом НМИЦ акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова МЗ РФ Бадлаевой А. С.

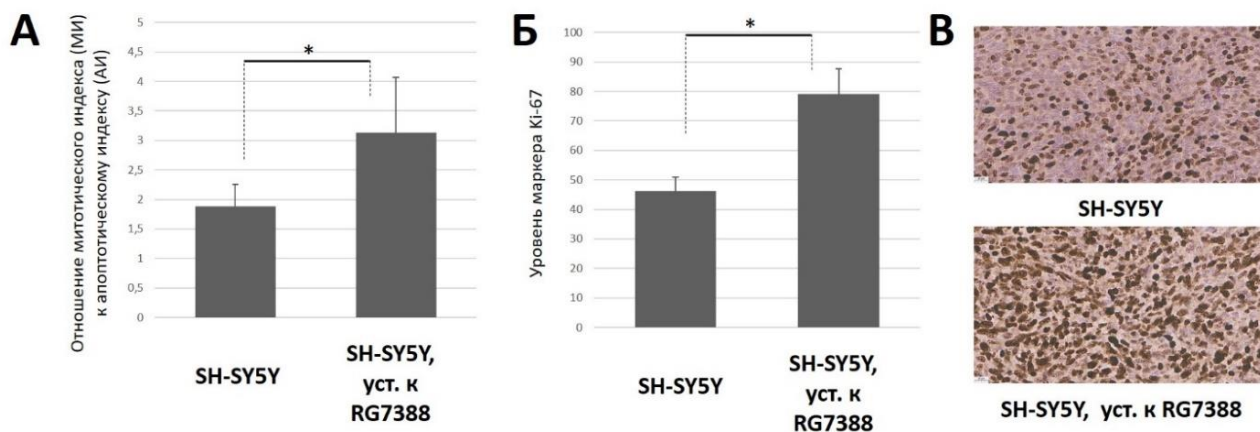


Рис. 44. Анализ пролиферативной активности клеток нейробластомы SH-SY5Y с повышенной устойчивостью к RG7388 в *in vivo* модели. А. Отношение митотического индекса (МИ) к апоптотическому индексу (АИ) в тканях мышинной ксенотрансплантантной модели нейробластомы, окрашенных гематоксилином и эозином. Б. Уровень маркера Ki-67 в в тканях мышинной ксенотрансплантантной модели нейробластомы. В. Репрезентативные изображения окраски Ki-67. Шкала – 20 мкм. Данные на гистограммах представлены как среднее \pm стандартное отклонение, $n=4$ (SH-SY5Y) и 6 (SH-SY5Y, уст. к RG7388), * $p<0,05$ (U-тест). Подробное описание экспериментальных методик приведено в соответствующем разделе «Материалы и методы». Опубликовано с модификациями в [261].

На первом этапе был определен уровень клеточного обновления, которая представляет собой отношение митотического индекса (МИ) к апоптотическому индексу (АИ) в тканях, окрашенных гематоксилином и эозином. Было обнаружено, что опухоли из группы SH-SY5Y, уст. к RG7388 обладали более высокой скоростью (~ 1.5 раза) клеточного обновления по сравнению с опухолями из группы SH-SY5Y (Рис. 44А).

На втором этапе было выполнено иммуногистохимическое окрашивание маркера пролиферативной активности Ki-67, который отображает число активно делящихся опухолевых клеток. Полученные результаты подтверждали повышенную пролиферацию в клетках нейробластомы с приобретенной устойчивостью к ингибированию MDM2 по сравнению с исходными клетками: в опухолях из группы SH-SY5Y, уст. к RG7388 уровень маркера Ki-67 был примерно в два раза выше по сравнению с опухолями из группы SH-SY5Y (Рис. 44Б, В).

Кроме того, для изучения возможных изменений биологических свойств в устойчивых к RG7388 клетках нейробластомы был проведен тест на клоногенную активность *in vitro*. Было выявлено, что резистентные клетки SH-SY5Y обладали значительно большей клоногенной активностью относительно исходных клеток и интенсивнее образовывали колонии (Рис. 45А), что подтверждает ранее представленные *in vivo* данные (Рис. 44).

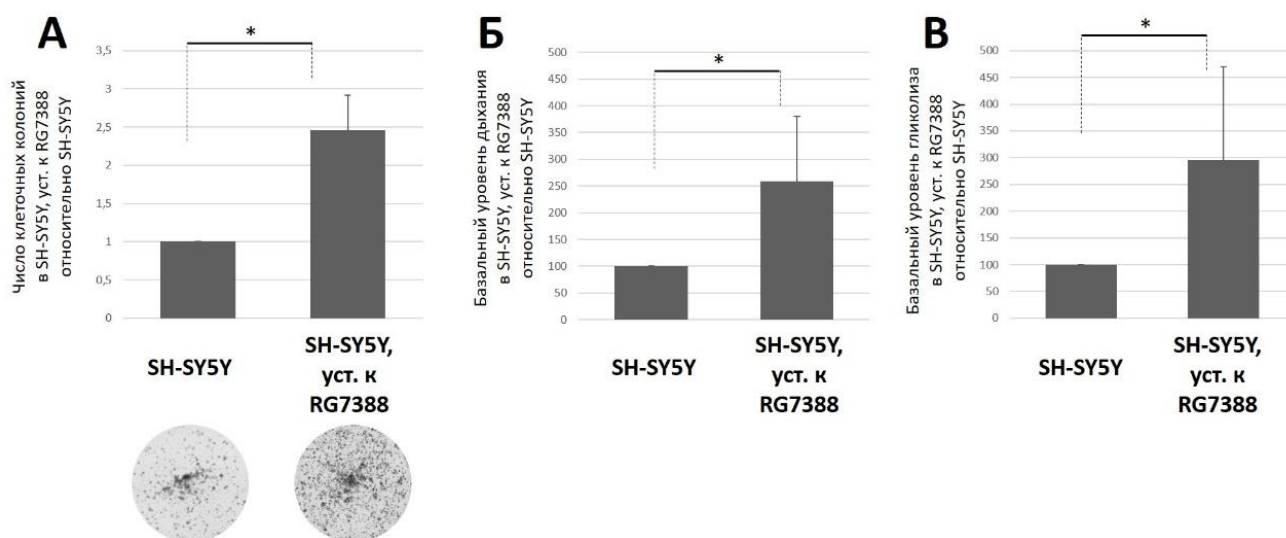


Рис. 45. Оценка клоногенной активности (А), базального уровня дыхания (Б) и гликолиза (В) клеток SH-SY5Y и SH-SY5Y, уст. к RG7388 в *in vitro* модели. Данные на гистограммах представлены как среднее \pm стандартное отклонение, $n=4$; * $p<0,05$ (U-тест). Пояснения к результатам приведены в соответствующих разделах «Материалы и методы» и указаны в тексте. Опубликовано с модификациями в [261].

Эти результаты могут быть обусловлены изменениями в метаболической активности устойчивых клеток, которые были обнаружены при помощи прибора Seahorse XF. Так, устойчивые клетки обладали как более высоким базальным уровнем дыхания, так и повышенным базальным уровнем гликолиза по сравнению с исходными клетками (Рис. 45Б, В).

Таким образом, данные результаты демонстрируют, что развитие приобретенной устойчивости опухолевых клеток к ингибированию MDM2 сопровождается значительными изменениями их клоногенной активности и

метаболического профиля, что может способствовать активной пролиферации мутантных клеток и увеличению объема опухолевой ткани у пациентов.

3.12. Оценка биологической активности новых производных имидазолина как новых антагонистов MDM2

Другая важнейшая проблема при использовании препаратов целевого действия помимо развития устойчивости обусловлена неблагоприятными фармакологическими свойствами, в частности, их низкой растворимостью в воде. Так, например, Нутлин-3а и его модификации – RG7112 и RG7388 практически полностью нерастворимы в воде [272], что отчасти обусловлено присутствием атомов галогенов в их структуре. В рамках данной работы была проанализирована биологическая активность производных имидазолина, содержащих алкильные группы вместо галогенов в качестве заместителей в бензольном кольце. Данные соединения были получены двухступенчатым синтезом из ароматических альдегидов и раствора аммиака с высоким выходом⁴. В ходе молекулярного моделирования было показано, что исследуемые вещества способны располагаться внутри активного сайта связывания MDM2, отвечающего за взаимодействие с p53, при этом геометрия связывания была схожа с геометрией связывания Нутлина-3а [260,272,273]. Оценка биологической активности осуществлялась методом Вестерн-блот анализа, который позволял определить потенциальное накопление p53 и p53-зависимых белков (p21), что является маркером действия препаратов, относящихся к антагонистам MDM2. Кроме того, проводился цитометрический анализ для выяснения возможной цитотоксичности полученных имидазолиновых производных. Стоит отметить, что нутлины во многих опухолевых клеточных линиях, содержащих p53 дикого типа, не вызывают гибель клеток в широком диапазоне концентраций при использовании в качестве индивидуальных агентов. Данная группа соединений активно применяется для запуска клеточной гибели в

⁴ Новые антагонисты MDM2, производные Нутлина-3а, были получены к.х.н., м.н.с. химического факультета МГУ им. М. В. Ломоносова Базановым Д. Р.

сочетании с другими препаратами (например, с химиотерапевтическим препаратом Цисплатином). Однако в некоторых линиях (например, в моделях нейробластомы) нутлины сами по себе способны запускать клеточную гибель, что в том числе было показано в настоящем исследовании [260,272,273].

Первоначально была оценена активность соединений, представляющих собой неполные аналоги Нутлина-3а, по сравнению с его фрагментом и полноразмерной молекулой Нутлина-3а при помощи Вестерн-блота в клетках колоректального рака RKO (Рис. 46). Данная линия была выбрана ввиду наличия в ней белка p53 дикого типа, но, в отличие от клеток нейробластомы SH-SY5Y и SK-N-SH эти клетки обладают низкой чувствительностью к действию антагонистов MDM2, что позволяет корректно оценить биологическую активность новых соединений. Время инкубации клеток после добавления субстанций составило 24 часа. Было продемонстрировано, что синтезированное соединение-лидер М (20 мкМ) ведет к стабилизации белка p53 до 3,8 раз по сравнению с контрольными клетками, что уступает по эффективности действия полной молекуле Нутлина-3а (20 мкМ), однако сопоставимо с его неполным фрагментом Р (20 мкМ), выбранным в качестве референса. Кроме того, все соединения не вызывали накопления фрагмента p89 PARP, что свидетельствует об отсутствии чувствительности клеток RKO к действию Нутлина-3а и о нетоксичности производного М (Рис. 46).

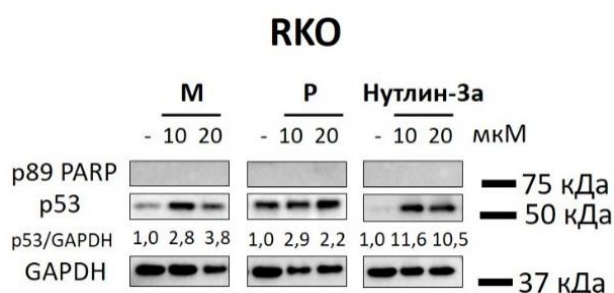


Рис. 46. Оценка эффективности действия алкоксиарилпроизводного М в сравнении с неполным фрагментом Нутлина-3а Р и полноразмерной молекулой в клетках RKO методом Вестерн-блот анализа. p89 – фрагмент белка PARP (89 кДа); p53/GAPDH – денситометрический анализ уровня накопления белка p53 после добавления исследуемых соединений в пересчете на

GAPDH, который был использован в качестве контроля загрузки геля. Время инкубации клеток после добавления препаратов составляет 24 часа. Опубликовано с модификациями в [273].

Далее были проведены эксперименты по модификации производных имидазолина по атому азота как для увеличения их растворимости в воде, так и для повышения эффективности связывания с активным центром белка MDM2: в первом случае были синтезированы новые сульфониламидоимидазолины (Рис. 47), во втором – карбамидные соединения (Рис. 48-49). Полученные соединения представляли собой полные аналоги Нутлина-3а, поэтому в качестве референсных соединений были использованы RG7112, RG7388 и Нутлин-3а. Анализ биологической активности был проведен с помощью Вестерн-блота. Потенциальная токсичность новых производных имидазолина была дополнительно оценена с помощью проточной цитометрии. Время инкубации клеток с новыми ингибиторами MDM2 составляло 24 часа.

По данным Вестерн-блот анализа было установлено, что новые сульфопроизводные имидазолина (соединения-лидеры, определенные в ходе предварительных испытаний) в микромолярных концентрациях (10-20 мкМ) вели к эффективной стабилизации p53 и аккумуляции p21 по сравнению с контрольными клетками (Рис. 47А), однако в эффективности действия существенно уступали Нутлину-3а в клетках RKO (Рис. 47Б). Кроме того, согласно результатам Вестерн-блота (расщепление белка PARP) и данным цитометрического анализа (окрашивание Аннексин/ЙП) было выявлено, что данные антагонисты MDM2 являются нетоксичными в указанных концентрациях (Рис. 47А, В). При использовании наномолярных концентраций (до 500 нМ) было обнаружено, что соединения MA-C1 и MA-C2 уступают в эффективности действия RG7112, однако сопоставимы с Нутлином-3а (Рис. 47Г-Е).

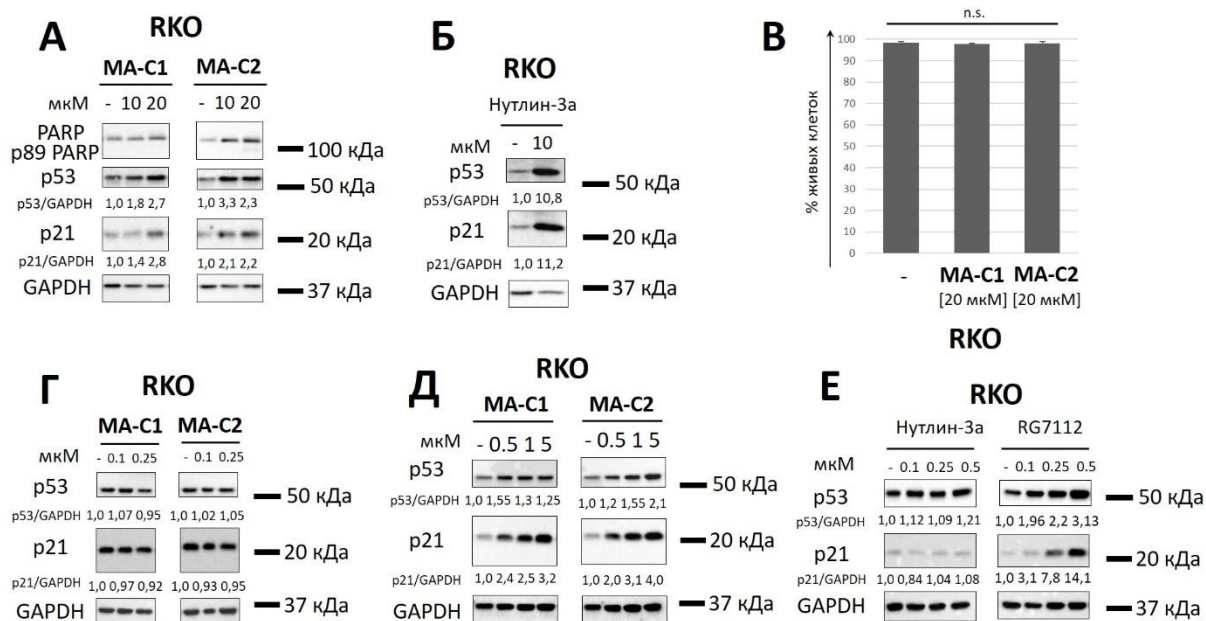


Рис. 47. Оценка эффективности сульфопроизводных имидазолина (MA-C1 и MA-C2) в сравнении с Нутлином-3а и RG7112 в клетках RKO. Результаты Вестерн-блот анализа (А, Б, Г-Е) и данные цитометрического анализа с окрашиванием Аннексин/ЙП (В) в клетках RKO. PARP – полноразмерная форма белка (116 кДа, сверху) и p89 – фрагмент белка PARP (89 кДа, снизу). p53/GAPDH и p21/GAPDH – денситометрический анализ уровней соответствующих белков после добавления ингибитора MDM2 в пересчете на GAPDH, который был использован в качестве контроля загрузки геля. Время инкубации клеток после добавления препаратов составляет 24 часа. Данные на гистограмме представлены как среднее \pm стандартное отклонение, $n=4$; n.s. – статистически не значимо (U-тест). Опубликовано с модификациями в [272].

Важно отметить, что исследуемые сульфозамещенные модификации имидазолинов обладали значительно большей растворимостью в воде в отличие от оригинальных нутлинов [272].

Также были оценены синтезированные карбамидные производные имидазолина. В ходе предварительных испытаний при помощи Вестерн-блот анализа были определены два соединения, которые вели к наибольшей стабилизации белка p53 среди всех исследованных молекул [260]. Так, например, М-К1 и М-К2 (оба – 20 мкМ) вели к выраженному накоплению белков p53 и p21, но несколько уступали по активности Нутлину-3а (10 мкМ) и RG7388 (5 мкМ) в клетках RKO (Рис. 48А, В, Г). Интересно, что МК-2, в отличие от МК-1, в

концентрации 20 мкМ приводил к появлению фрагмента p89 PARP (Рис. 48А). Запуск клеточной гибели при использовании МК-2 наблюдался по результатам проточной цитометрии с окрашиванием Аннексин/ЙП: число живых клеток уменьшалось с 95% (контроль) до 85% (МК-2, 20 мкМ). Эти данные могут свидетельствовать о неспецифичной токсичности данного соединения. Важно подчеркнуть, что Нутлин-3а (20 мкМ) не вел к запуску клеточной гибели (Рис. 46) в клетках RKO, однако использование его более активных модификаций (RG7388 и RG7112) в этой же концентрации выражалось в расщеплении белка PARP и снижению размера популяции живых клеток до 73% и 57% соответственно (Рис. 48Д, Е). Таким образом, неспецифическая токсичность в концентрации 20 мкМ в этой модели колоректального рака характерна и для оригинальных представителей группы нутлинов.

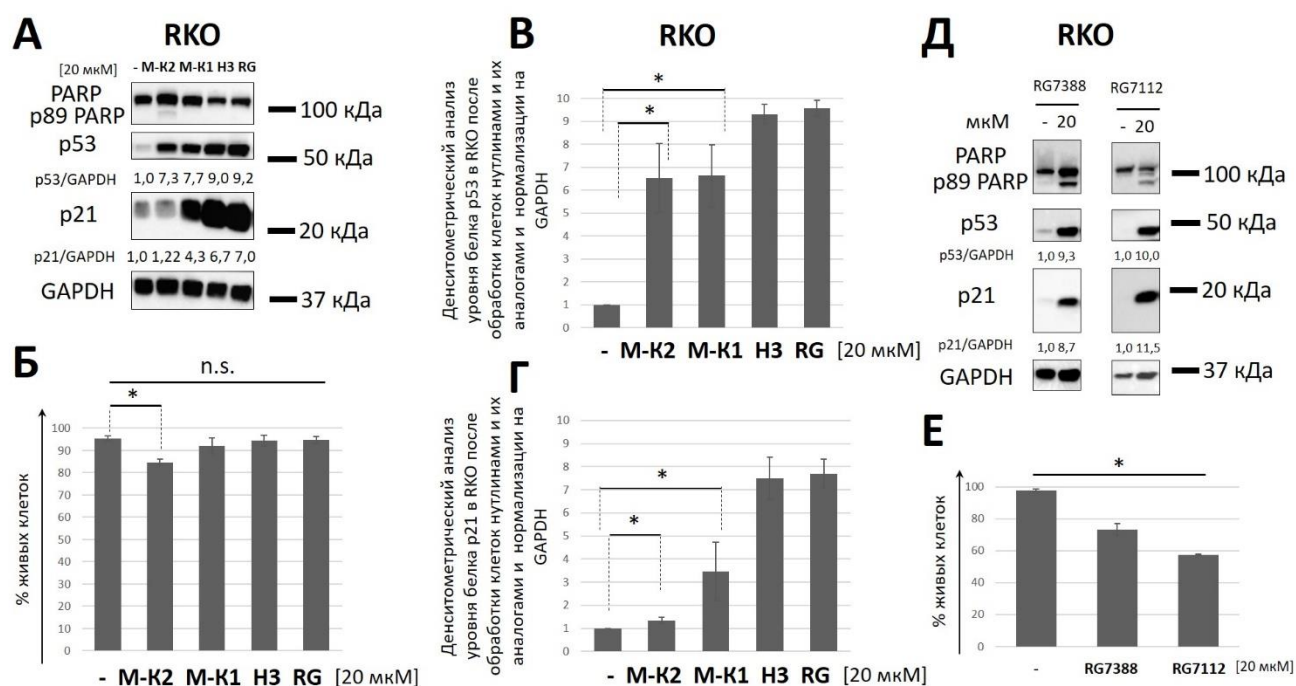


Рис. 48. Оценка биологической активности карбамидных производных имидазолина (М-К1 и М-К2 – оба 20 мкМ) в сравнении с Нутлином-3а (Н3, 10 мкМ) и RG7388 (RG, 5 мкМ) в клетках колоректального рака RKO. Результаты Вестерн-блот анализа (А, Д), денситометрического анализа (В, Г) и данные цитометрического анализа с окрашиванием Аннексин/ЙП (Б, Е) в клетках RKO. PARP – полноразмерная форма белка (116 кДа, сверху) и p89

– фрагмент белка PARP (89 кДа, снизу). p53/GAPDH и p21/GAPDH – денситометрический анализ уровней соответствующих белков после добавления тестируемых и референсных препаратов в пересчете на GAPDH, который был использован в качестве контроля загрузки геля. Время инкубации клеток после добавления соединений составляет 24 часа. Данные на гистограммах представлены как среднее \pm стандартное отклонение, n=4 (U-тест). Опубликовано с модификациями в [260].

Наконец, как в случае сульфониламидных производных имидазолина, была произведена оценка их активности в наномолярных концентрациях в клетках RKO в сравнении с Нутлином-3а, RG7112 и RG7388. Было показано, что вещества М-К1 и М-К2 в концентрациях до 500 нМ уступают в эффективности действия RG7112 и RG7388, однако сопоставимы с Нутлином-3а (Рис. 49).

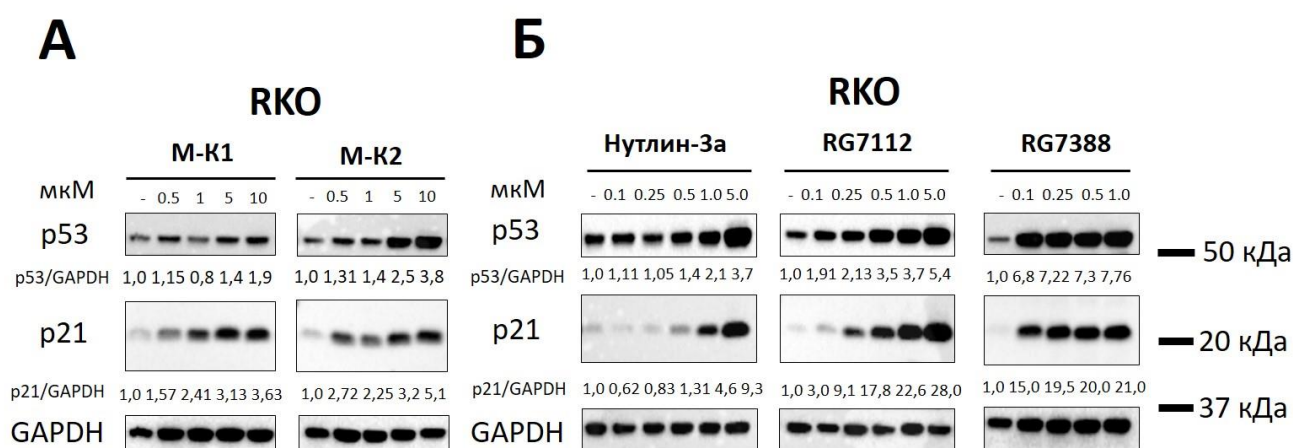


Рис. 49. Оценка биологической активности карбамидных производных имидазолина (М-К1 и М-К2) в сравнении с Нутлином-3а, RG7112 и RG7388 в диапазоне концентраций от 0,1 до 10 мкМ в клетках колоректального рака RKO. Результаты Вестерн-блот анализа (А, Б) в клетках RKO. p53/GAPDH и p21/GAPDH – денситометрический анализ уровней соответствующих белков после добавления тестируемых и референсных препаратов в пересчете на GAPDH, который был использован в качестве контроля загрузки геля. Время инкубации клеток после добавления соединений составляет 24 часа. Пояснения к результатам приведены в тексте. Опубликовано с модификациями в [260].

Таким образом, было установлено, что синтезированные алкоксиарилпроизводные имидазолина способны к эффективному ингибированию MDM2, и в наномолярных концентрациях (до 500 нМ) соединения-лидеры были

сопоставимы по эффективности действия с Нутлином-3а. Кроме того, они не обладали токсичными свойствами, а ряд из них имел улучшенные физико-химические свойства по сравнению с оригинальными нутлинами. Полученные результаты могут быть значимыми для модификации современных подходов получения новых противоопухолевых препаратов.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Появление лекарственной устойчивости к действию различных препаратов, в том числе противоопухолевых, является одной из актуальных проблем современной медицины. Развитие такой нечувствительности к препаратам ведет к неэффективному лечению многих заболеваний, а случае онкологических пациентов может привести к их летальному исходу.

На протяжении последних десятилетий для терапии опухолей широко применяются химиотерапевтические препараты, которые в большинстве своем относятся к группе ДНК-повреждающих агентов (например, Цисплатин, Доксорубин) и обеспечивают элиминацию быстроделющихся мутантных клеток. Несмотря на высокую эффективность такие препараты вызывают серьезные побочные эффекты из-за неселективности действия и повреждения здоровых клеток организма, а также развитие рецидивов вследствие выживания устойчивых к терапии клонов.

В настоящий момент проходит активное изучение и внедрение в клиническую практику противораковых соединений целевого действия, которые направлены на определенные молекулярные мишени и во многом позволяют решить проблему селективности действия. К таким веществам относятся антагонисты Mcl-1 и MDM2, изучаемые в ходе настоящего исследования. Однако, к сожалению, и для них было показано наличие приобретенной устойчивости в опухолевых клетках при продолжительном применении [15,16]. Изучение механизмов, лежащих в основе развития резистентности к данным препаратам, может существенным образом повысить эффективность их использования и способствовать разрешению для клинического применения в будущем.

На одном из начальных этапов исследования был осуществлен сравнительный анализ эффективности действия двух селективных антагонистов Mcl-1 S63845 и A1210477. Как было отмечено ранее, оба соединения эффективно запускают апоптотическую гибель в различных клеточных линиях [92,191]. Важно отметить,

что максимальная концентрация A1210477 (10 мкМ) была выбрана с учетом его неселективной токсичности: ранее было упомянуто, что более высокие дозы данного соединения способны запускать клеточную гибель путем активации каспаз, но без участия белков Bак/Bах [189], а кроме того, они могут разрушать комплексы Bcl-2/Bim, то есть происходит уже ингибирование не только Mcl-1, но и другого антиапоптотического белка - Bcl-2 [191]. Проведенный анализ показал, что A1210477 демонстрировал меньшую проапоптотическую эффективность по сравнению с соединением S63845 из-за неполного разрушения белковых комплексов между Mcl-1 и Bак. Кроме того, это позволило определить роль белка Bак в качестве важного предикторного фактора, определяющего чувствительность опухолевых клеток к действию ингибиторов Mcl-1, что было подтверждено при помощи различных биоинженерных подходов (трансфекция миРНК и получение нокаутных клеток методом CRISPR/Cas9) в различных моделях солидных опухолей. При этом была показана ключевая роль белка Bак для реализации гибели клеток, вызванной ингибированием Mcl-1. В частности, подавление Bак понижало эффективность антагониста Mcl-1 S63845, но не ДНК-повреждающего агента Цисплатина. Таким образом, оценка уровня Bак является значимой для прогнозирования ответа злокачественных клеток на действие антагонистов Mcl-1. С учетом полученных сведений, стоит заметить, что потенциальное появление мутаций в гене *BAK1*, которые могут привести к функционально значимым аминокислотным заменам в структуре белка Bак и ослабить его порообразующую способность и/или взаимодействие с Mcl-1, может в конечном итоге негативно влиять на запуск апоптоза при ингибировании Mcl-1 и стать одной из возможных причин устойчивости опухолевых клеток к препаратам данной группы.

Линии опухолевых клеток являются очень распространенной моделью для изучения механизмов лекарственной устойчивости [274]. Поэтому на следующем этапе были получены клетки солидных опухолей различного происхождения (HeLa, H23, SK-N-Be(2)c), характеризующиеся приобретенной повышенной устойчивостью к действию S63845. Как было наглядно продемонстрировано в ходе

данной работы, указанные клеточные линии обладают исходной высокой чувствительностью к ингибированию Mcl-1, что объясняет целесообразность их использования в рамках настоящего исследования. Необходимо отметить, что крайне важным является момент выбора стратегии получения резистентных клеточных линий. Так, существуют два основных подхода создания устойчивости в *in vitro* модели: а) «пульсовый» метод – кратковременная обработка опухолевых клеток низкими концентрациями препарата с постепенным повышением дозы и последующим интервалом «восстановления» (без препарата); б) длительная (до 6 месяцев) инкубация опухолевых клеток с высокими концентрациями противораковых агентов [250,275]. Обе стратегии имеют свои особенности и широко используются в различных исследованиях [248,250].

«Пульсовый» подход имитирует условия химиотерапии онкологических больных, когда злокачественные клетки находятся в присутствии низких концентраций препаратов в течение относительно коротких периодов и имеют достаточно времени для восстановления. Именно таким образом пациенты проходят несколько циклов химиотерапии. Следовательно, этот подход считается клинически значимой моделью. В этом случае, исходя из сравнения значений IC₅₀, увеличение устойчивости к противораковым препаратам не слишком велико (в 1,5–5 раз) [250,276]. Важно, что эти данные хорошо согласуются с индексом резистентности для опухолевых клеток, полученных от пациентов [275].

Вторая модель развития приобретенной устойчивости позволяет создавать клеточные линии с высоким уровнем резистентности. В этом случае опухолевые клетки культивируются в присутствии высоких концентраций препаратов с течением времени, что способствует выживанию наиболее злокачественных клонов. Однако этот подход не соответствует условиям, когда пациенты проходят противораковую терапию, и может приводить к получению артефактных результатов [250,274,275].

Как было представлено ранее, в рамках данной работы для получения устойчивых клеток к ингибированию Mcl-1 или MDM2 был использован «пульсовый» подход ввиду его большей клинической релевантности. Однако в то же время стоит подчеркнуть, что, несмотря на огромное количество исследований, посвященных этой теме, до сих пор отсутствует понимание того, какой набор методов позволит получить наиболее полную информацию о механизмах развития резистентности [250,275].

После получения устойчивых клеток в них были проанализированы уровни других антиапоптотических белков семейства Bcl-2, поскольку в подобных моделях часто наблюдается ранее упомянутый компенсаторный феномен: ингибирование одного антиапоптотического белка сопровождается повышением уровней других белков этого семейства, способствующих выживанию мутантных клонов. Установлено, что в двух линиях наблюдаются изменения в белковом профиле антиапоптотических белков: в клетках HeLa повышается Bcl-xL, в клетках SK-N-Be(2)c – Bcl-2. При помощи метода ПЦР в реальном времени было обнаружено, что указанные изменения происходят на транскрипционном уровне: отбираются те злокачественные клоны, в которых увеличивается экспрессия генов белков Bcl-xL или Bcl-2. Более того, эти клоны становились менее чувствительны к запуску апоптоза в условиях подавления Mcl-1 методом трансфекции миРНК по сравнению с исходными клетками. Следовательно, их выживание теперь в меньшей степени определяется белком Mcl-1 в сравнении с материнскими популяциями клеток, напротив, они становятся более «зависимыми» от других антиапоптотических белков - Bcl-xL или Bcl-2. Стоит выделить особо, что клеточные линии солидных опухолей различной этиологии, не обладающие исходной чувствительностью к действию S63845, также характеризовались повышенными уровнями Bcl-xL или Bcl-2. Исходя из этих данных, можно сделать несколько выводов. Во-первых, белки Bcl-xL или Bcl-2 наряду с Bax являются ключевыми предикторными маркерами, определяющими ответ опухолевых клеток на действие антагонистов Mcl-1. Во-вторых, одной из возможных причин

приобретения опухолевыми клетками резистентности к ингибированию Mcl-1 является повышение экспрессии генов других антиапоптотических представителей белкового семейства Bcl-2. Интересно, что указанные изменения не происходят в случае клеток H23, что говорит о вкладе иных факторов в развитие устойчивости к действию S63845, которые требуют дальнейшего изучения. Так, например, это может быть ассоциировано с возможными мутациями в гене белка Mcl-1 и соответствующими изменениями его структуры, прежде всего в ВНЗ-связывающем кармане. Такие перестройки в свою очередь будут препятствовать эффективному связыванию антагонистом его мишени. Подобный эффект был ранее показан для Венетоклакса, антагониста Bcl-2 [7].

Как было отмечено выше, сочетания различных ВНЗ-миметиков могут преодолеть приобретенную устойчивость к одному из них [7]. Поскольку две из трех устойчивые популяции клеток стали более «зависимыми» от белков Bcl-xL или Bcl-2, то в рамках данной работы была проведена оценка целесообразности совместного использования антагонистов Bcl-2 и Mcl-1, а также Bcl-xL и Mcl-1 для преодоления устойчивости опухолевых клеток к действию S63845. Было показано, что во всех трех устойчивых моделях указанные комбинации эффективно преодолевали данный тип резистентности вне зависимости от изменений белкового профиля семейства Bcl-2 в них. Более того, сочетания антагонистов антиапоптотических белков позволяли снизить используемые концентрации препаратов, что имеет терапевтическую значимость, поскольку использование низких концентраций позволяет уменьшить вероятность развития потенциальных побочных эффектов и предотвратить развитие приобретенной устойчивости к их действию.

Несмотря на высокую эффективность обеих комбинаций, наиболее рациональной стратегией является одновременное подавление Bcl-2 и Mcl-1. При совместном ингибировании Bcl-xL и Mcl-1 наблюдалась выраженная клеточная гибель уже спустя 6 часов даже в условиях подавления двух эффекторных белков

(Bak и Bax). Полученные данные, свидетельствующие о чрезмерной токсичности совместного ингибирования Bcl-xL и Mcl-1, согласуются с результатами других исследований [277]. Таким образом, потенциальное применение этой комбинации препаратов на пациентах может привести к появлению неблагоприятных побочных эффектов, связанных с гибелью здоровых клеток.

Также в ходе данного исследования была показана прогностическая значимость уровней белков семейства Bcl-2 у пациентов с аденокарциномой легкого. Так, например, пациенты с повышенным уровнем Bak и пониженными уровнями Bcl-xL и Mcl-1 обладали наиболее благоприятным прогнозом выживаемости по сравнению с пациентами, обладающими другим профилем экспрессии генов этих белков. Поскольку высокое содержание белка Bak и низкое содержание белка Bcl-xL способствуют реализации S63845-опосредованной клеточной гибели, то возможное применение антагонистов Mcl-1 является клинически обоснованным у пациентов, обладающих подобным белковым профилем.

Комбинирование противораковых агентов позволяет не только преодолеть уже выработанную лекарственную устойчивость, но и предотвратить ее развитие благодаря возможному достижению синергетического эффекта и использованию меньших доз препаратов по сравнению с монотерапией. Такой подход будет также приводить к уменьшению токсических эффектов в здоровых тканях. Кроме того, рациональные сочетания противоопухолевых соединений способствуют расширению области их применения, действуя в тех типах рака, где они могут быть неэффективными в качестве индивидуальных агентов. Как уже было не раз упомянуто, комбинация антагониста Bcl-2 Венетоклакса и антагониста MDM2 RG7388 сейчас активно изучается в клинических испытаниях на пациентах с различными гематологическими и солидными опухолями, включая нейробластому (NCT04029688). В настоящем исследовании была показана целесообразность сочетания S63845 и RG7388 в клетках нейробластомы SK-N-SH и SH-SY5Y. Как

уже было отмечено, выбранные линии характеризуются содержанием белка p53 дикого типа, что является необходимым условием для действия антагонистов MDM2. Было установлено, что обе линии отличаются низкой чувствительностью к ингибированию Mcl-1: S63845 не вызывал в них запуска апоптоза. Однако он усиливал RG7388-индуцированную клеточную гибель в широком диапазоне концентраций (100 нМ – 1 мкМ). В основе синергизма, вероятнее всего, лежит увеличение уровня p53-зависимых проапоптотических факторов, таких как Bax, Puma при действии антагониста MDM2, и высвобождение проапоптотических факторов (главным образом, эффекторного белка Bax) из комплексов с Mcl-1 (Рис. 32). Полученные результаты демонстрируют рациональность одновременного подавления Mcl-1 и MDM2 и требуют дальнейшего изучения в доклинических моделях. Кроме того, эти данные показывают целесообразность совместного использования антагонистов MDM2 и ингибиторов антиапоптотических белков как терапевтического подхода в целом.

Для антагонистов MDM2 также существует проблема развития приобретенной устойчивости. С целью прояснения возможных механизмов этого феномена и выбора стратегии ее преодоления были выведены клетки SH-SY5Y, обладающие повышенной устойчивостью к RG7388. Схема получения устойчивых клеток к ингибированию MDM2 была принципиально схожа с выведением резистентных популяций к ингибированию Mcl-1 за одним исключением – не использовался ингибитор Р-гликопротеина. Одной из наиболее частых причин развития нечувствительности к противоопухолевой терапии является повышенная экспрессия генов белков множественной лекарственной устойчивости, в частности, Р-гликопротеина. Однако ранее было показано, что антагонисты MDM2 из семейства нутлинов ведут к подавлению экспрессии гена Р-гликопротеина [263], поэтому развитие резистентности за счет активации систем «обратного выброса» для этого класса препаратов маловероятно.

При помощи Вестерн-блот анализа было установлено, что в клетках SH-SY5Y, уст. к RG7388, наблюдается снижение накопления p53 и p53-зависимых белков под действием антагониста MDM2 по сравнению с материнской популяцией клеток, что может свидетельствовать о нарушенной транскрипционной активности белка p53. Последующий анализ при помощи метода ПЦР подтвердил транскрипционный механизм этих изменений. Таким образом, полученные данные косвенно свидетельствуют о возможном появлении мутаций в структуре p53, которые нарушили его транскрипционную активность. Для подтверждения этой гипотезы был проведен NGS анализ гена p53 в исходных и устойчивых клонах, который обнаружил наличие трех мутаций в последних. Одна из них (His193Arg) находилась в ДНК-связывающем домене p53 и могла повлиять на его функциональную активность. Последующий биоинформатический анализ выявил, что данная мутация не препятствует взаимодействию p53 с ДНК, однако ведет к нарушению стабилизации тетрамерного комплекса p53-ДНК, тем самым негативно влияя на транскрипционную активность p53. Важно отметить, что аминокислотная замена His193Arg встречается у онкологических больных с различными типами опухолей (наиболее часто – в тканях яичников, молочной железы и легкого).

С целью преодоления устойчивости к подавлению MDM2 была рассмотрена комбинация антагонистов MDM2 (RG7388) и Mcl-1 (S63845), которая вела к выраженному синергизму в исходных клетках SH-SY5Y. Было предположено, что в случае нарушенной функциональной активности белка p53, наблюдаемой в устойчивых клетках, запуск внутреннего пути апоптоза за счет ингибирования антиапоптотического белка Mcl-1 позволит преодолеть данный тип резистентности. Было установлено, что S63845 усиливал RG7388-индуцированную клеточную гибель, однако это усиление было существенно менее выраженным в устойчивых клетках по сравнению с исходной популяцией, что свидетельствует лишь о частичном преодолении устойчивости мутантных клеток к RG7388.

Также была проанализирована целесообразность использования ДНК-повреждающих агентов Цисплатина и Доксорубицина для этой задачи. Оба химиопрепарата были менее эффективны в резистентных клетках по сравнению с материнскими как в монотерапии, так и в комбинации с RG7388 в *in vitro* экспериментах. Более того, Доксорубин в отличие от клеток SH-SY5Y гораздо менее эффективно подавлял опухолевый рост в ксенотрансплантантной мышинной модели нейробластомы с клетками SH-SY5Y, уст. к RG7388. Таким образом, несмотря на высокую противоопухолевую активность, RG7388 имеет выраженный недостаток: при долговременном лечении в больших дозах он может привести к образованию опухолей, которые не будут отвечать даже на традиционные химиотерапевтические соединения. Вероятно, что именно по этой причине клинические исследования RG7388/Идасанутлина в качестве монотерапии не были успешными [8,13]. Поэтому наиболее рациональной стратегией может являться использование нутлинов в низких дозах в комбинациях с другими препаратами, например, ВНЗ-миметиками.

Стоит отметить особо клиническую значимость мутаций p53, наличие которых может привести к неблагоприятному прогнозу выживаемости онкологических больных вне зависимости от применения антагонистов MDM2. Наличие аминокислотных замен в белке p53, в частности, His193Arg, могут быть важными предикторными маркерами в клинических исследованиях, которые могут спрогнозировать эффективность применения различных противоопухолевых агентов.

Необходимо подчеркнуть, что лекарственная устойчивость может быть связана не только с нарушениями запуска гибели, но и с изменениями в скорости пролиферации клеток. При этом оба процесса характеризуются изменениями клеточного метаболизма. Так, например, резистентность к Цисплатину может быть опосредована сниженной пролиферативной активностью устойчивых клонов по сравнению с исходной популяцией клеток [250]. Интересно, что метаболические

модификации резистентных клеток различного происхождения могут быть разнонаправленными. К примеру, некоторые клеточные популяции, устойчивые к Цисплатину, снижают активность гликолиза и усиливают клеточное дыхание, в то время как другие клоны переходят преимущественно на анаэробный метаболизм, усиливая гликолитическое окисление глюкозы и блокируя окислительное фосфорилирование [278].

В рамках данной работы была проанализирована пролиферативная активность устойчивых к ингибированию MDM2 клеток нейробластомы в *in vitro* и *in vivo* экспериментах. При помощи различных подходов (клоногенный тест, гистологические и иммуногистохимические методы) было обнаружено, что SH-SY5Y, уст. к RG7388 обладают более высокой пролиферацией по сравнению с исходными клетками SH-SY5Y. Данное обстоятельство можно объяснить изменениями в клеточном метаболизме: устойчивые клетки обладали как повышенным базальным гликолизом, так и базальным уровнем клеточного дыхания. Стоит заметить, что полученные результаты сопоставимы с данными других исследований. Так, был неоднократно описан феномен «приобретения функции»: в клетках с мутантным белком p53 последний не только не выполняет свои онкосупрессорные функции, но и придает им дополнительный онкогенный потенциал, способствующий развитию и прогрессированию опухоли. В частности, такие опухоли могут характеризоваться повышенной пролиферацией, инвазией, миграцией. Кроме того, в них может изменяться метаболизм (усиливаться гликолиз и синтез жирных кислот). Наконец, наличие мутантного p53 способствует развитию резистентности к химиопрепаратам за счет различных механизмов [261,279].

Наконец, в рамках данного исследования была оценена биологическая активность новых антагонистов MDM2, представляющих собой аналоги Нутлина-3а. Полученные соединения были способны эффективно ингибировать MDM2, что приводило к стабилизации p53 и p53-зависимых белков. В наномолярных

концентрациях их активность была сопоставима с действием Нутлина-3а. Более того, они обладают большей растворимостью по сравнению с оригинальными нутлинами. Таким образом, полученные результаты говорят о том, что данные ингибиторы могут служить экспериментальной основой для создания новых водорастворимых противоопухолевых препаратов из группы антагонистов MDM2.

ГЛАВА 5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе настоящей работы были изучены механизмы приобретенной устойчивости к антагонистам Mcl-1 и MDM2, а также оценены возможные стратегии ее преодоления. Так, было обнаружено, что эффекторный белок Bax является важным предикторным маркером, определяющим чувствительность опухолевых клеток к ингибиторам Mcl-1. Повышение экспрессии генов других антиапоптотических белков, в частности Bcl-2 и Bcl-xL, является одной из причин развития приобретенной устойчивости и исходной низкой чувствительности опухолевых клеток к действию антагониста Mcl-1 S63845. Таким образом, уровни белков Bcl-2 и Bcl-xL также являются важными предикторами чувствительности опухолевых клеток к блокированию Mcl-1. Комбинирование антагонистов этих белков с S63845 позволяет преодолеть устойчивость злокачественных клеток к действию последнего. Была выявлено прогностическое значение семейства Bcl-2 у пациентов с аденокарциномой легкого: повышенный уровень Bax и пониженные уровни Bcl-xL и Mcl-1 определяли наиболее благоприятный исход выживаемости пациентов по сравнению с другим профилем экспрессии генов этих белков.

Установлено, что S63845 ведет к усилению апоптотической гибели, индуцированной антагонистом MDM2 RG7388, что демонстрирует рациональность использования данной комбинации в последующих исследованиях. Показано, что в основе устойчивости клеток нейробластомы к действию RG7388 лежит замена в структуре p53, нарушающая его транскрипционную активность из-за дестабилизации взаимодействия p53 с ДНК. Как итог, происходит уменьшение накопления p53 и p53-зависимых белков под действием RG7388. Химиопрепараты Цисплатин и Доксорубицин были менее эффективны в качестве монотерапии в клетках нейробластомы с приобретенной устойчивостью к RG7388 в *in vitro* и *in vivo* моделях. Однако Цисплатин или S63845 в комбинации с RG7388 вели к частичному преодолению устойчивости к действию последнего. Кроме того, было показано, что новые аналоги нутлинов обладают

биологической активностью и улучшенными физико-химическими свойствами. Таким образом, результаты, полученные в ходе настоящего диссертационного исследования, могут внести существенный вклад в развитие новых стратегий противоопухолевой терапии.

ВЫВОДЫ

1. Проапоптотический белок Bax и антиапоптотические белки Bcl-xL и Bcl-2 являются предикторными факторами, определяющими чувствительность опухолевых клеток к действию антагонистов Mcl-1, а увеличение уровней белков Bcl-2 или Bcl-xL ведет к развитию приобретенной устойчивости опухолевых клеток к действию антагониста Mcl-1 S63845.
2. Комбинирование антагонистов Bcl-2 или Bcl-xL с антагонистом Mcl-1 S63845 обеспечивает преодоление устойчивости опухолевых клеток к действию последнего.
3. Пониженные уровни белков Bcl-xL и Mcl-1 и повышенный уровень белка Bax по сравнению с другим профилем экспрессии генов этих белков определяют благоприятный прогноз выживаемости пациентов с аденокарциномой легкого.
4. В основе развития приобретенной устойчивости опухолевых клеток к действию антагониста MDM2 RG7388 лежит изменение структуры белка p53 вследствие появления мутаций в гене этого белка. Замена гистидина на аргинин в положении 193 в структуре белка p53 ведет к дестабилизации его взаимодействия с ДНК и, как следствие, снижению транскрипционной активности p53.
5. ДНК-повреждающие агенты Цисплатин и Доксорубин менее эффективны в качестве монотерапии в клетках нейробластомы с приобретенной устойчивостью к действию антагониста MDM2 RG7388 *in vitro* и *in vivo*, а антагонист Mcl-1 S63845 или Цисплатин в комбинации с RG7388 обеспечивают частичное преодоление данного типа устойчивости.
6. Новые антагонисты MDM2, представляющие собой аналоги Нутлина-3а, обладают способностью стабилизировать уровень p53 и улучшенными физико-химическими свойствами по сравнению с Нутлином-3а.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ РАБОТЫ

1. Bazanov D.R. 2,4,5-Tris(alkoxyaryl)imidazoline derivatives as potent scaffold for novel p53-MDM2 interaction inhibitors: Design, synthesis, and biological evaluation / Bazanov D.R., **Pervushin N.V.**, Savitskaya V.Y., Anikina L.V., Proskurnina M.V., Lozinskaya N.A., Kopeina G.S. // *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. – 2019. – Vol. 29, № 16. – P. 2364–2368. WoS (JIF, JCI) = 2.5, 0.75 (0.58;0.19)
2. **Pervushin N.V.** Mcl-1 as a “barrier” in cancer treatment: Can we target it now? / Pervushin N.V., Senichkin V.V., Zhivotovsky B., Kopeina G.S. // *International Review of Cell and Molecular Biology*. – 2020. – Vol. 351. – P. 23–55. Scopus (IF, SJR) = 6.8, 2.0 (3.81;3.24)
3. Сеничкин В.В. Таргетирование белков семейства Bcl-2: что, где, когда? / Сеничкин В.В., **Первушин Н.В.**, Зуев А.П., Животовский Б., Копейна Г.С. // *Биохимия*. – 2020. – Т. 85, № 10. – С. 1421–1441. WoS (JIF, JCI) = 2.3, 0.36 (2.43;0.61)
4. **Первушин Н.В.** Деградация Mcl-1 в условиях недостатка питательных веществ происходит независимо от аутофагии / Первушин Н.В., Сеничкин В.В., Капуста А.А., Горбунова А.С., Каминский В.О., Животовский Б., Копейна Г.С. // *Биохимия*. – 2020. – Т. 85, № 10. – С. 1452–1463. WoS (JIF, JCI) = 2.3, 0.36 (1.39;0.51)
5. Bazanov D.R. Sulfonamide derivatives of cis-imidazolines as potent p53-MDM2/MDMX protein-protein interaction inhibitors / Bazanov D.R., **Pervushin N.V.**, Savin E.V., Tsymliakov M.D., Maksutova A.I., Sosonyuk S.E., Kopeina G.S., Lozinskaya N.A. // *Medicinal Chemistry Research*. – 2021. – Vol. 30, № 12. – P. 2216–2227. WoS (JIF, JCI) = 2.6, 0.6 (1.39;0.63)
6. Senichkin V.V. Bak and Bcl-xL Participate in Regulating Sensitivity of Solid Tumor Derived Cell Lines to Mcl-1 Inhibitors / Senichkin V.V., **Pervushin N.V.**, Zamaraev A.V., Sazonova E.V., Zuev A.P., Streletskaya A.Y., Prikazchikova T.A., Zatsepin T.S., Kovaleva O.V., Tchekina E.M., Zhivotovsky B., Kopeina G.S. // *Cancers*. – 2022. – Vol. 14, № 1. – P. 181. WoS (JIF, JCI) = 4.5, 0.91 (2.2;1.1)

7. Bazanov D.R. Synthetic Design and Biological Evaluation of New p53-MDM2 Interaction Inhibitors Based on Imidazoline Core / Bazanov D.R., **Pervushin N.V.**, Savin E.V., Tsymliakov M-D., Maksutova A.I., Savitskaya V.Yu., Sosonyuk S.E., Gracheva Y.A., Seliverstov M.Yu., Lozinskaya N.A., Kopeina G.S. // *Pharmaceuticals*. – 2022. – Vol. 15, № 4. – P. 444. WoS (JIF, JCI) = 4.3, 1.08 (2.08;1.07)
8. **Pervushin N.V.** Bcl-B: an “unknown” protein of the Bcl-2 family / **Pervushin N.V.**, Kopeina G.S., Zhivotovsky B. // *Biology Direct*. – 2023. – Vol. 18, № 1. – P. 69. WoS (JIF, JCI) = 5.7, 1.28 (0.81;0.73)
9. Sazonova E.V. Cancer Drug Resistance: Targeting Proliferation or Programmed Cell Death / Sazonova E.V., Yaprntseva M.A., **Pervushin N.V.**, Tsvetcov R.I., Zhivotovsky B., Kopeina G.S. // *Cells*. – 2024. – Vol. 13, № 5. – P. 388. WoS (JIF, JCI) = 5.1, 0.67 (1.85;0.48)
10. **Pervushin N.V.** BH3-mimetics or DNA-damaging agents in combination with RG7388 overcome p53 mutation-induced resistance to MDM2 inhibition / **Pervushin N.V.**, Nilov D.K., Pushkarev S.V., Shipunova V.O., Badlaeva A.S., Yaprntseva M.A., Kopytova D.V., Zhivotovsky B., Kopeina G.S. // *Apoptosis*. – 2024. – Vol. 29, № 11-12. – P. 2197–2213. WoS (JIF, JCI) = 6.1, 0.85 (1.96;1.47)
11. **Pervushin N.V.** Cisplatin Resistance and Metabolism: Simplification of Complexity / **Pervushin N.V.**, Yaprntseva M.A., Panteleev M.A., Zhivotovsky B., Kopeina G.S. // *Cancers*. – 2024. – Vol. 16, № 17. – P. 3082. WoS (JIF, JCI) = 4.5, 0.91 (1.5;0.75)*

*В скобках приведен объем публикации в условных печатных листах и вклад автора в условных печатных листах.

СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Patil M.R., Bihari A. A comprehensive study of p53 protein // J. Cell. Biochem. – 2022. – Vol. 123, № 12. – P. 1891–1937.
2. Sung H. et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries // CA. Cancer J. Clin. 2021. – Vol. 71, № 3. – P. 209–249.
3. Hanahan D., Weinberg R.A. The Hallmarks of Cancer // Cell. – 2000. – Vol. 100, № 1. – P. 57–70.
4. Hanahan D., Weinberg R.A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation // Cell. – 2011. – Vol. 144, № 5. – P. 646–674.
5. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions // Cancer Discov. – 2022. – Vol. 12, № 1. – P. 31–46.
6. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death // Toxicol. Pathol. – 2007. – Vol. 35, № 4. – P. 495–516.
7. Сеничкин В.В. et al. Таргетирование белков семейства Bcl-2: что, где, когда? // Биохимия. – 2020. – Т. 85, № 10. – С. 1421–1441.
8. Hassin O., Oren M. Drugging p53 in cancer: one protein, many targets // Nat. Rev. Drug Discov. – 2023. – Vol. 22, № 2. – P. 127–144.
9. Levine A.J. p53, the cellular gatekeeper for growth and division // Cell. – 1997. – Vol. 88, № 3. – P. 323–331.
10. Ozaki T., Nakagawara A. Role of p53 in Cell Death and Human Cancers // Cancers. – 2011. – Vol. 3, № 1. – P. 994–1013.
11. Zhou X., Hao Q., Lu H. Mutant p53 in cancer therapy-the barrier or the path // J. Mol. Cell Biol. – 2019. – Vol. 11, № 4. – P. 293–305.
12. Pervushin N.V. et al. Mcl-1 as a “barrier” in cancer treatment: Can we target it now? // Int. Rev. Cell Mol. Biol. – 2020. – Vol. 351. – P. 23–55.

13. Fallatah M.M.J. et al. Small-molecule correctors and stabilizers to target p53 // Trends Pharmacol. Sci. – 2023. – Vol. 44, № 5. – P. 274–289.
14. Aleksakhina S.N., Kashyap A., Imyanitov E.N. Mechanisms of acquired tumor drug resistance // Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer. – 2019. – Vol. 1872, № 2. – P. 188310.
15. Tantawy S.I. et al. Targeting MCL-1 protein to treat cancer: opportunities and challenges // Front. Oncol. – 2023. – Vol. 13. – P. 1226289.
16. Haronikova L. et al. Resistance mechanisms to inhibitors of p53-MDM2 interactions in cancer therapy: can we overcome them? // Cell. Mol. Biol. Lett. – 2021. – Vol. 26, № 1. – P. 53.
17. Vogt, C. Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte der Geburtshelferkroete (*Alytes obstetricans*)', Bild 5 von 156 | MDZ.
18. Glucksmann A. Cell deaths in normal vertebrate ontogeny // Biol. Rev. Camb. Philos. Soc. – 1951. – Vol. 26, № 1. – P. 59–86.
19. Saunders J.W. Death in embryonic systems // Science. – 1966. – Vol. 154, № 3749. – P. 604–612.
20. Lockshin R.A., Williams C.M. Programmed cell death--i. cytology of degeneration in the intersegmental muscles of the pernyi silkworm // J. Insect Physiol. – 1965. – Vol. 11. – P. 123–133.
21. Kerr J.F., Wyllie A.H., Currie A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics // Br. J. Cancer. – 1972. – Vol. 26, № 4. – P. 239–257.
22. Животовский Б. Программируемая гибель клеток: исторические заметки из России // Биохимия. – 2020. – Т. 85, № 10. – С. 1323–1330.
23. Kopeina G.S., Zhivotovsky B. Programmed cell death: Past, present and future // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2022. – Vol. 633. – P. 55–58.

24. Vitale I. et al. Apoptotic cell death in disease-Current understanding of the NCCD 2023 // *Cell Death Differ.* – 2023. – Vol. 30, № 5. – P. 1097–1154.
25. Galluzzi L. et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018 // *Cell Death Differ.* – 2018. – Vol. 25, № 3. – P. 486–541.
26. Conradt B. Genetic control of programmed cell death during animal development // *Annu. Rev. Genet.* – 2009. – Vol. 43. – P. 493–523.
27. Fuchs Y., Steller H. Programmed cell death in animal development and disease // *Cell.* – 2011. – Vol. 147, № 4. – P. 742–758.
28. Zhang X. et al. MLKL and FADD Are Critical for Suppressing Progressive Lymphoproliferative Disease and Activating the NLRP3 Inflammasome // *Cell Rep.* – 2016. – Vol. 16, № 12. – P. 3247–3259.
29. Yang W.S., Stockwell B.R. Ferroptosis: Death by Lipid Peroxidation // *Trends Cell Biol.* – 2016. – Vol. 26, № 3. – P. 165–176.
30. Fang Y. et al. Pyroptosis: A new frontier in cancer // *Biomed. Pharmacother. Biomedecine Pharmacother.* – 2020. – Vol. 121. – P. 109595.
31. Glick D., Barth S., Macleod K.F. Autophagy: cellular and molecular mechanisms // *J. Pathol.* – 2010. – Vol. 221, № 1. – P. 3–12.
32. Taylor R.C., Cullen S.P., Martin S.J. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2008. – Vol. 9, № 3. – P. 231–241.
33. Fuchs Y., Steller H. Live to die another way: modes of programmed cell death and the signals emanating from dying cells // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2015. – Vol. 16, № 6. – P. 329–344.
34. Fadok V.A. et al. The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes // *Cell Death Differ.* 1998. – Vol. 5. – № 7. – P. 551–562.

35. Naeini M.B. et al. The role of phosphatidylserine recognition receptors in multiple biological functions // *Cell. Mol. Biol. Lett.* 2020. – Vol. 25. – P. 23.
36. Van Opdenbosch N., Lamkanfi M. Caspases in Cell Death, Inflammation, and Disease // *Immunity.* – 2019. – Vol. 50, № 6. – P. 1352–1364.
37. Kesavardhana S., Malireddi R.K.S., Kanneganti T.-D. Caspases in Cell Death, Inflammation, and Pyroptosis // *Annu. Rev. Immunol.* – 2020. – Vol. 38. P. – 567–595.
38. Kopeina G.S., Zhivotovsky B. Caspase-2 as a master regulator of genomic stability // *Trends Cell Biol.* – 2021. – Vol. 31, № 9. – P. 712–720.
39. Lavrik I.N., Krammer P.H. Regulation of CD95/Fas signaling at the DISC // *Cell Death Differ.* – 2012. – Vol. 19, № 1. – P. 36–41.
40. Kischkel F.C. et al. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor // *EMBO J.* – 1995. – Vol. 14, № 22. – P. 5579–5588.
41. Gibert B., Mehlen P. Dependence Receptors and Cancer: Addiction to Trophic Ligands // *Cancer Res.* – 2015. – Vol. 75, № 24. – P. 5171–5175.
42. Zamaraev A.V. et al. Cell death controlling complexes and their potential therapeutic role // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2015. – Vol. 72, № 3. – P. 505–517.
43. Hill M.M. et al. Analysis of the composition, assembly kinetics and activity of native Apaf-1 apoptosomes // *EMBO J.* – 2004. – Vol. 23, № 10. – P. 2134–2145.
44. Jost P.J. et al. XIAP discriminates between type I and type II FAS-induced apoptosis // *Nature.* – 2009. – Vol. 460, № 7258. – P. 1035–1039.
45. Degtarev A., Boyce M., Yuan J. A decade of caspases // *Oncogene.* – 2003. – Vol. 22, № 53. – P. 8543–8567.
46. Wolf B.B. et al. Caspase-3 is the primary activator of apoptotic DNA fragmentation via DNA fragmentation factor-45/inhibitor of caspase-activated DNase inactivation // *J. Biol. Chem.* – 1999. – Vol. 274, № 43. – P. 30651–30656.

47. Plesca D., Mazumder S., Almasan A. DNA damage response and apoptosis // *Methods Enzymol.* – 2008. – Vol. 446. – P. 107–122.
48. Crowley L.C. et al. Dead Cert: Measuring Cell Death // *Cold Spring Harb. Protoc.* – 2016. – Vol. 2016, № 12. – P. pdb.top070318.
49. Tinel A., Tschopp J. The PIDDosome, a protein complex implicated in activation of caspase-2 in response to genotoxic stress // *Science.* – 2004. – Vol. 304, № 5672. – P. 843–846.
50. Егоршина А.Ю. et al. Каспаза-2 – онкосупрессор и регулятор метаболизма: Что день грядущий нам готовит? // *Молекулярная Биология.* – 2018. – Т. 52, № 5. – С. 750–763.
51. Wang H. et al. Targeting p53 pathways: mechanisms, structures, and advances in therapy // *Signal Transduct. Target. Ther.* – 2023. – Vol. 8, № 1. – P. 92.
52. Youle R.J., Strasser A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2008. – Vol. 9, № 1. – P. 47–59.
53. Czabotar P.E. et al. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2014. – Vol. 15, № 1. – P. 49–63.
54. Ozören N., El-Deiry W.S. Defining characteristics of Types I and II apoptotic cells in response to TRAIL // *Neoplasia N. Y. N.* – 2002. – Vol. 4, № 6. – P. 551–557.
55. Twiddy D. et al. Pro-apoptotic proteins released from the mitochondria regulate the protein composition and caspase-processing activity of the native Apaf-1/caspase-9 apoptosome complex // *J. Biol. Chem.* – 2004. – Vol. 279, № 19. – P. 19665–19682.
56. Tu H., Costa M. XIAP's Profile in Human Cancer // *Biomolecules.* – 2020. – Vol. 10, № 11. – P. 1493.
57. Shiozaki E.N., Shi Y. Caspases, IAPs and Smac/DIABLO: mechanisms from structural biology // *Trends Biochem. Sci.* – 2004. – Vol. 29, № 9. – P. 486–494.

58. Saraste A., Pulkki K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis // *Cardiovasc. Res.* – 2000. – Vol. 45, № 3. – P. 528–537.
59. Bholá P.D., Letai A. Mitochondria—Judges and Executioners of Cell Death Sentences // *Mol. Cell.* – 2016. – Vol. 61, № 5. – P. 695–704.
60. Delbridge A.R.D. et al. Thirty years of BCL-2: translating cell death discoveries into novel cancer therapies // *Nat. Rev. Cancer.* – 2016. – Vol. 16, № 2. – P. 99–109.
61. Czabotar P.E., Garcia-Saez A.J. Mechanisms of BCL-2 family proteins in mitochondrial apoptosis // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2023.
62. Gross A., Katz S.G. Non-apoptotic functions of BCL-2 family proteins // *Cell Death Differ.* – 2017. – Vol. 24, № 8. – P. 1348–1358.
63. Mandal T. et al. Assembly of Bak homodimers into higher order homooligomers in the mitochondrial apoptotic pore // *Sci. Rep.* – 2016. – Vol. 6. – P. 30763.
64. Kalkavan H., Green D.R. MOMP, cell suicide as a BCL-2 family business // *Cell Death Differ.* – 2018. – Vol. 25, № 1. – P. 46–55.
65. Bonzerato C.G., Wojcikiewicz R.J.H. Bok: real killer or bystander with non-apoptotic roles? // *Front. Cell Dev. Biol.* – 2023. – Vol. 11. – P. 1161910.
66. Shalaby R., Flores-Romero H., García-Sáez A.J. The Mysteries around the BCL-2 Family Member BOK // *Biomolecules.* – 2020. – Vol. 10, № 12. – P. 1638.
67. Cory S. et al. Targeting BCL-2-like Proteins to Kill Cancer Cells // *Trends Cancer.* – 2016. – Vol. 2, № 8. – P. 443–460.
68. Rong Y.-P. et al. The BH4 domain of Bcl-2 inhibits ER calcium release and apoptosis by binding the regulatory and coupling domain of the IP3 receptor // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2009. – Vol. 106, № 34. – P. 14397–14402.
69. Monaco G. et al. A double point mutation at residues Ile14 and Val15 of Bcl-2 uncovers a role for the BH4 domain in both protein stability and function // *FEBS J.* – 2018. – Vol. 285, № 1. – P. 127–145.

70. Uhlen M. et al. A pathology atlas of the human cancer transcriptome // *Science*. – 2017. – Vol. 357, № 6352. – P. eaan2507.
71. Uhlén M. et al. Proteomics. Tissue-based map of the human proteome // *Science*. – 2015. – Vol. 347, № 6220. – P. 1260419.
72. Nakano T. et al. Overexpression of Antiapoptotic MCL-1 Predicts Worse Overall Survival of Patients With Non-small Cell Lung Cancer // *Anticancer Res.* – 2020. – Vol. 40, № 2. – P. 1007–1014.
73. Williams J. et al. Expression of Bcl-xL in ovarian carcinoma is associated with chemoresistance and recurrent disease // *Gynecol. Oncol.* – 2005. – Vol. 96, № 2. – P. 287–295.
74. Pervushin N.V., Kopeina G.S., Zhivotovsky B. Bcl-B: an “unknown” protein of the Bcl-2 family // *Biol. Direct.* – 2023. – Vol. 18, № 1. – P. 69.
75. Doerflinger M., Glab J.A., Puthalakath H. BH3-only proteins: a 20-year stock-take // *FEBS J.* – 2015. – Vol. 282, № 6. – P. 1006–1016.
76. Oda E. et al. Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis // *Science*. – 2000. – Vol. 288, № 5468. – P. 1053–1058.
77. Nakano K., Vousden K.H. PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53 // *Mol. Cell.* – 2001. – Vol. 7, № 3. – P. 683–694.
78. Michalak E.M. et al. Puma and to a lesser extent Noxa are suppressors of Myc-induced lymphomagenesis // *Cell Death Differ.* – 2009. – Vol. 16, № 5. – P. 684–696.
79. Eischen C.M. et al. Bax loss impairs Myc-induced apoptosis and circumvents the selection of p53 mutations during Myc-mediated lymphomagenesis // *Mol. Cell. Biol.* – 2001. – Vol. 21, № 22. – P. 7653–7662.
80. Lessene G., Czabotar P.E., Colman P.M. BCL-2 family antagonists for cancer therapy // *Nat. Rev. Drug Discov.* – 2008. – Vol. 7, № 12. – P. 989–1000.

81. Zantl N. et al. Frequent loss of expression of the pro-apoptotic protein Bim in renal cell carcinoma: evidence for contribution to apoptosis resistance // *Oncogene*. – 2007. – Vol. 26, № 49. – P. 7038–7048.
82. Kuwana T. et al. BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate Bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly // *Mol. Cell*. – 2005. – Vol. 17, № 4. – P. 525–535.
83. Chen L. et al. Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function // *Mol. Cell*. – 2005. – Vol. 17, № 3. – P. 393–403.
84. Dai H. et al. Contribution of Bcl-2 phosphorylation to Bak binding and drug resistance // *Cancer Res*. – 2013. – Vol. 73, № 23. – P. 6998–7008.
85. Pogmore J.P., Uehling D., Andrews D.W. Pharmacological Targeting of Executioner Proteins: Controlling Life and Death // *J. Med. Chem*. – 2021. – Vol. 64, № 9. – P. 5276–5290.
86. Reyna D.E. et al. Direct Activation of BAX by BTSA1 Overcomes Apoptosis Resistance in Acute Myeloid Leukemia // *Cancer Cell*. – 2017. – Vol. 32, № 4. – P. 490-505.e10.
87. Konopleva M. et al. Mechanisms of apoptosis sensitivity and resistance to the BH3 mimetic ABT-737 in acute myeloid leukemia // *Cancer Cell*. – 2006. – Vol. 10, № 5. – P. 375–388.
88. Montero J., Haq R. Adapted to Survive: Targeting Cancer Cells with BH3 Mimetics // *Cancer Discov*. – 2022. – Vol. 12, № 5. – P. 1217–1232.
89. Arellano M.L. et al. A phase II, multicenter, open-label study of obatoclax mesylate in patients with previously untreated myelodysplastic syndromes with anemia or thrombocytopenia // *Clin. Lymphoma Myeloma Leuk*. – 2014. – Vol. 14, № 6. – P. 534–539.

90. Souers A.J. et al. ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets // *Nat. Med.* – 2013. – Vol. 19, № 2. – P. 202–208.
91. Tao Z.-F. et al. Discovery of a Potent and Selective BCL-XL Inhibitor with in Vivo Activity // *ACS Med. Chem. Lett.* – 2014. – Vol. 5, № 10. – P. 1088–1093.
92. Kotschy A. et al. The MCL1 inhibitor S63845 is tolerable and effective in diverse cancer models // *Nature.* – 2016. – Vol. 538, № 7626. – P. 477–482.
93. Montero J., Letai A. Why do BCL-2 inhibitors work and where should we use them in the clinic? // *Cell Death Differ.* – 2018. – Vol. 25, № 1. – P. 56–64.
94. Certo M. et al. Mitochondria primed by death signals determine cellular addiction to antiapoptotic BCL-2 family members // *Cancer Cell.* – 2006. – Vol. 9, № 5. – P. 351–365.
95. Potter D.S., Letai A. To Prime, or Not to Prime: That Is the Question // *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* – 2016. – Vol. 81. – P. 131–140.
96. Singh R., Letai A., Sarosiek K. Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2019. – Vol. 20, № 3. – P. 175–193.
97. Wilson W.H. et al. Navitoclax, a targeted high-affinity inhibitor of BCL-2, in lymphoid malignancies: a phase 1 dose-escalation study of safety, pharmacokinetics, pharmacodynamics, and antitumour activity // *Lancet Oncol.* – 2010. – Vol. 11, № 12. – P. 1149–1159.
98. Mason K.D. et al. Programmed anuclear cell death delimits platelet life span // *Cell.* – 2007. – Vol. 128, № 6. – P. 1173–1186.
99. Del Gaizo Moore V. et al. Chronic lymphocytic leukemia requires BCL2 to sequester prodeath BIM, explaining sensitivity to BCL2 antagonist ABT-737 // *J. Clin. Invest.* – 2007. – Vol. 117, № 1. – P. 112–121.

100. Pan R. et al. Selective BCL-2 inhibition by ABT-199 causes on-target cell death in acute myeloid leukemia // *Cancer Discov.* – 2014. – Vol. 4, № 3. – P. 362–375.
101. Konopleva M. et al. Efficacy and Biological Correlates of Response in a Phase II Study of Venetoclax Monotherapy in Patients with Acute Myelogenous Leukemia // *Cancer Discov.* – 2016. – Vol. 6, № 10. – P. 1106–1117.
102. Touzeau C. et al. BH3 profiling identifies heterogeneous dependency on Bcl-2 family members in multiple myeloma and predicts sensitivity to BH3 mimetics // *Leukemia.* – 2016. – Vol. 30, № 3. – P. 761–764.
103. Lochmann T.L. et al. Venetoclax Is Effective in Small-Cell Lung Cancers with High BCL-2 Expression // *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* – 2018. – Vol. 24, № 2. – P. 360–369.
104. Oltersdorf T. et al. An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours // *Nature.* – 2005. – Vol. 435, № 7042. – P. 677–681.
105. Mérimo D. et al. Bcl-2, Bcl-x(L), and Bcl-w are not equivalent targets of ABT-737 and navitoclax (ABT-263) in lymphoid and leukemic cells // *Blood.* – 2012. – Vol. 119, № 24. – P. 5807–5816.
106. Casara P. et al. S55746 is a novel orally active BCL-2 selective and potent inhibitor that impairs hematological tumor growth // *Oncotarget.* – 2018. – Vol. 9, № 28. – P. 20075–20088.
107. Deng J. et al. Lisaftoclax (APG-2575) Is a Novel BCL-2 Inhibitor with Robust Antitumor Activity in Preclinical Models of Hematologic Malignancy // *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* – 2022. – Vol. 28, № 24. – P. 5455–5468.
108. Zhai Y. et al. Lisaftoclax in Combination with Alrizomadlin Overcomes Venetoclax Resistance in Acute Myeloid Leukemia and Acute Lymphoblastic Leukemia: Preclinical Studies // *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* – 2023. – Vol. 29, № 1. – P. 183–196.

109. Ailawadhi S. et al. Novel BCL-2 Inhibitor Lisaftoclax in Relapsed or Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia and Other Hematologic Malignancies: First-in-Human Open-Label Trial // *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* – 2023. – Vol. 29, № 13. – P. 2385–2393.
110. Diepstraten S.T. et al. The manipulation of apoptosis for cancer therapy using BH3-mimetic drugs // *Nat. Rev. Cancer.* – 2022. – Vol. 22, № 1. – P. 45–64.
111. Negi A., Voisin-Chiret A.S. Strategies to Reduce the On-Target Platelet Toxicity of Bcl-xL Inhibitors: PROTACs, SNIPERs and Prodrug-Based Approaches // *Chembiochem Eur. J. Chem. Biol.* – 2022. – Vol. 23, № 12. – P. e202100689.
112. Zhang X. et al. Targeting anti-apoptotic BCL-2 family proteins for cancer treatment // *Future Med. Chem.* – 2020. – Vol. 12, № 7. – P. 563–565.
113. Mørk S.K. et al. First in man study: Bcl-XL₄₂-CAF®09b vaccines in patients with locally advanced prostate cancer // *Front. Immunol.* – 2023. – Vol. 14. – P. 1122977.
114. Qian L. et al. Therapeutic potential of the novel Bcl-2/Bcl-XL dual inhibitor, APG1252, alone or in combination against non-small cell lung cancer // *Mol. Carcinog.* – 2022. – Vol. 61, № 11. – P. 1031–1042.
115. Hartman M.L., Czyz M. BCL-w: apoptotic and non-apoptotic role in health and disease // *Cell Death Dis.* – 2020. – Vol. 11, № 4. – P. 260.
116. Lee E.F. et al. Crystal structure of a BCL-W domain-swapped dimer: implications for the function of BCL-2 family proteins // *Struct. Lond. Engl.* 1993. – 2011. – Vol. 19, № 10. – P. 1467–1476.
117. Wang G., Diepstraten S.T., Herold M.J. Last but not least: BFL-1 as an emerging target for anti-cancer therapies // *Biochem. Soc. Trans.* – 2022. – Vol. 50, № 4. – P. 1119–1128.
118. Harvey E.P. et al. Identification of a Covalent Molecular Inhibitor of Anti-apoptotic BFL-1 by Disulfide Tethering // *Cell Chem. Biol.* – 2020. – Vol. 27, № 6. – P. 647-656.e6.

119. Senichkin V.V. et al. Molecular Comprehension of Mcl-1: From Gene Structure to Cancer Therapy // Trends Cell Biol. – 2019. – Vol. 29, № 7. – P. 549–562.
120. Kozopas K.M. et al. MCL1, a gene expressed in programmed myeloid cell differentiation, has sequence similarity to BCL2 // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. – 1993. – Vol. 90, № 8. – P. 3516–3520.
121. Rinkenberger J.L. et al. Mcl-1 deficiency results in peri-implantation embryonic lethality // Genes Dev. – 2000. – Vol. 14, № 1. – P. 23–27.
122. Arbour N. et al. Mcl-1 Is a Key Regulator of Apoptosis during CNS Development and after DNA Damage // J. Neurosci. – 2008. – Vol. 28, № 24. – P. 6068–6078.
123. Dzhagalov I., Dunkle A., He Y.-W. The anti-apoptotic Bcl-2 family member Mcl-1 promotes T lymphocyte survival at multiple stages // J. Immunol. Baltim. Md 1950. – 2008. – Vol. 181, № 1. – P. 521–528.
124. Opferman J.T. et al. Obligate role of anti-apoptotic MCL-1 in the survival of hematopoietic stem cells // Science. – 2005. – Vol. 307, № 5712. – P. 1101–1104.
125. De Blasio A., Vento R., Di Fiore R. Mcl-1 targeting could be an intriguing perspective to cure cancer // J. Cell. Physiol. – 2018. – Vol. 233, № 11. – P. 8482–8498.
126. Germain M., Duronio V. The N terminus of the anti-apoptotic BCL-2 homologue MCL-1 regulates its localization and function // J. Biol. Chem. – 2007. – Vol. 282, № 44. – P. 32233–32242.
127. Thomas L.W., Lam C., Edwards S.W. Mcl-1; the molecular regulation of protein function // FEBS Lett. – 2010. – Vol. 584, № 14. – P. 2981–2989.
128. Akgul C. Mcl-1 is a potential therapeutic target in multiple types of cancer // Cell. Mol. Life Sci. CMLS. – 2009. – Vol. 66, № 8. – P. 1326–1336.
129. Becker T.M. et al. Mutant B-RAF-Mcl-1 survival signaling depends on the STAT3 transcription factor // Oncogene. – 2014. – Vol. 33, № 9. – P. 1158–1166.

130. Cui J., Placzek W.J. Post-Transcriptional Regulation of Anti-Apoptotic BCL2 Family Members // *Int. J. Mol. Sci.* – 2018. – Vol. 19, № 1. – P. 308.
131. Gomez-Bougie P. et al. Noxa controls Mcl-1 ubiquitination through the regulation of the Mcl-1/USP9X interaction // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2011. – Vol. 413, № 3. – P. 460–464.
132. Mojsa B., Lassot I., Desagher S. Mcl-1 ubiquitination: unique regulation of an essential survival protein // *Cells.* – 2014. – Vol. 3, № 2. – P. 418–437.
133. Первушин Н.В. et al. Деградация Mcl-1 в условиях недостатка питательных веществ происходит независимо от аутофагии // *Биохимия.* – 2020. – Т. 85, № 10. – С. 1452–1463.
134. Kale J., Osterlund E.J., Andrews D.W. BCL-2 family proteins: changing partners in the dance towards death // *Cell Death Differ.* – 2018. – Vol. 25, № 1. – P. 65–80.
135. Nakajima W. et al. DNA damaging agent-induced apoptosis is regulated by MCL-1 phosphorylation and degradation mediated by the Noxa/MCL-1/CDK2 complex // *Oncotarget.* – 2016. – Vol. 7, № 24. – P. 36353–36365.
136. Wei G. et al. Chemical genomics identifies small-molecule MCL1 repressors and BCL-xL as a predictor of MCL1 dependency // *Cancer Cell.* – 2012. – Vol. 21, № 4. – P. 547–562.
137. Brotin E. et al. Bcl-XL and MCL-1 constitute pertinent targets in ovarian carcinoma and their concomitant inhibition is sufficient to induce apoptosis // *Int. J. Cancer.* – 2010. – Vol. 126, № 4. – P. 885–895.
138. Ding Q. et al. Myeloid cell leukemia-1 inversely correlates with glycogen synthase kinase-3beta activity and associates with poor prognosis in human breast cancer // *Cancer Res.* – 2007. – Vol. 67, № 10. – P. 4564–4571.
139. Song L. et al. Mcl-1 regulates survival and sensitivity to diverse apoptotic stimuli in human non-small cell lung cancer cells // *Cancer Biol. Ther.* – 2005. – Vol. 4, № 3. – P. 267–276.

140. Li L. et al. Synergistic induction of apoptosis in high-risk DLBCL by BCL2 inhibition with ABT-199 combined with pharmacologic loss of MCL1 // *Leukemia*. – 2015. – Vol. 29, № 8. – P. 1702–1712.
141. Shi P. et al. Overcoming Acquired Resistance to AZD9291, A Third-Generation EGFR Inhibitor, through Modulation of MEK/ERK-Dependent Bim and Mcl-1 Degradation // *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* – 2017. – Vol. 23, № 21. – P. 6567–6579.
142. Wertz I.E. et al. Sensitivity to antitubulin chemotherapeutics is regulated by MCL1 and FBW7 // *Nature*. – 2011. – Vol. 471, № 7336. – P. 110–114.
143. Chen W. et al. Acquired activation of the Akt/cyclooxygenase-2/Mcl-1 pathway renders lung cancer cells resistant to apoptosis // *Mol. Pharmacol.* – 2010. – Vol. 77, № 3. – P. 416–423.
144. Lucas K.M. et al. Modulation of NOXA and MCL-1 as a strategy for sensitizing melanoma cells to the BH3-mimetic ABT-737 // *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* – 2012. – Vol. 18, № 3. – P. 783–795.
145. Elgendy M. et al. Beclin 1 restrains tumorigenesis through Mcl-1 destabilization in an autophagy-independent reciprocal manner // *Nat. Commun.* – 2014. – Vol. 5. – P. 5637.
146. Perciavalle R.M. et al. Anti-apoptotic MCL-1 localizes to the mitochondrial matrix and couples mitochondrial fusion to respiration // *Nat. Cell Biol.* – 2012. – Vol. 14, № 6. – P. 575–583.
147. Senichkin V.V. et al. Saga of Mcl-1: regulation from transcription to degradation // *Cell Death Differ.* – 2020. – Vol. 27, № 2. – P. 405–419.
148. Pawlikowska P. et al. ATM-dependent expression of IEX-1 controls nuclear accumulation of Mcl-1 and the DNA damage response // *Cell Death Differ.* – 2010. – Vol. 17, № 11. – P. 1739–1750.

149. Young A.I. et al. Myeloid cell leukemia 1 (MCL-1), an unexpected modulator of protein kinase signaling during invasion // *Cell Adhes. Migr.* – 2018. – Vol. 12, № 6. – P. 513–523.
150. Zeidner J.F., Karp J.E. Clinical activity of alvocidib (flavopiridol) in acute myeloid leukemia // *Leuk. Res.* – 2015. – Vol. 39, № 12. – P. 1312–1318.
151. Dey J. et al. Voruciclib, a clinical stage oral CDK9 inhibitor, represses MCL-1 and sensitizes high-risk Diffuse Large B-cell Lymphoma to BCL2 inhibition // *Sci. Rep.* – 2017. – Vol. 7, № 1. – P. 18007.
152. Chen R. et al. Cyclin-dependent kinase inhibitor fadraciclib (CYC065) depletes anti-apoptotic protein and synergizes with venetoclax in primary chronic lymphocytic leukemia cells // *Leukemia.* – 2022. – Vol. 36, № 6. – P. 1596–1608.
153. Cidado J. et al. AZD4573 Is a Highly Selective CDK9 Inhibitor That Suppresses MCL-1 and Induces Apoptosis in Hematologic Cancer Cells // *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* – 2020. – Vol. 26, № 4. – P. 922–934.
154. Hu S. et al. Discovery and Characterization of SY-1365, a Selective, Covalent Inhibitor of CDK7 // *Cancer Res.* – 2019. – Vol. 79, № 13. – P. 3479–3491.
155. Xiao L. et al. Targeting CDK9 with selective inhibitors or degraders in tumor therapy: an overview of recent developments // *Cancer Biol. Ther.* – 2023. – Vol. 24, № 1. – P. 2219470.
156. Pradelli L.A. et al. Glycolysis inhibition sensitizes tumor cells to death receptors-induced apoptosis by AMP kinase activation leading to Mcl-1 block in translation // *Oncogene.* – 2010. – Vol. 29, № 11. – P. 1641–1652.
157. Li H. et al. Downregulation of MCL-1 and upregulation of PUMA using mTOR inhibitors enhance antitumor efficacy of BH3 mimetics in triple-negative breast cancer // *Cell Death Dis.* – 2018. – Vol. 9, № 2. – P. 137.
158. Liu H. et al. Targeting PI3K/AKT/mTOR pathway to enhance the anti-leukemia efficacy of venetoclax // *Exp. Cell Res.* – 2022. – Vol. 417, № 2. – P. 113192.

159. Lang F. et al. A phase I study of a dual PI3-kinase/mTOR inhibitor BEZ235 in adult patients with relapsed or refractory acute leukemia // *BMC Pharmacol. Toxicol.* – 2020. – Vol. 21, № 1. – P. 70.
160. Rodon J. et al. Phase 1/1b dose escalation and expansion study of BEZ235, a dual PI3K/mTOR inhibitor, in patients with advanced solid tumors including patients with advanced breast cancer // *Cancer Chemother. Pharmacol.* – 2018. – Vol. 82, № 2. – P. 285–298.
161. Carlo M.I. et al. A Phase Ib Study of BEZ235, a Dual Inhibitor of Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) and Mammalian Target of Rapamycin (mTOR), in Patients With Advanced Renal Cell Carcinoma // *The Oncologist.* – 2016. – Vol. 21, № 7. – P. 787–788.
162. Salazar R. et al. Phase II Study of BEZ235 versus Everolimus in Patients with Mammalian Target of Rapamycin Inhibitor-Naïve Advanced Pancreatic Neuroendocrine Tumors // *The Oncologist.* – 2018. – Vol. 23, № 7. – P. 766-e90.
163. Huber S. et al. Sorafenib induces cell death in chronic lymphocytic leukemia by translational downregulation of Mcl-1 // *Leukemia.* – 2011. – Vol. 25, № 5. – P. 838–847.
164. Rahmani M. et al. Apoptosis induced by the kinase inhibitor BAY 43-9006 in human leukemia cells involves down-regulation of Mcl-1 through inhibition of translation // *J. Biol. Chem.* – 2005. – Vol. 280, № 42. – P. 35217–35227.
165. Wang R. et al. Sorafenib Inhibition of Mcl-1 Accelerates ATRA-Induced Apoptosis in Differentiation-Responsive AML Cells // *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* – 2016. – Vol. 22, № 5. – P. 1211–1221.
166. Lin C.-L. et al. Norcantharidin induces mitochondrial-dependent apoptosis through Mcl-1 inhibition in human prostate cancer cells // *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* – 2017. – Vol. 1864, № 10. – P. 1867–1876.

167. Pongrakhananon V. et al. Monosaccharide digitoxin derivative sensitize human non-small cell lung cancer cells to anoikis through Mcl-1 proteasomal degradation // *Biochem. Pharmacol.* – 2014. – Vol. 88, № 1. – P. 23–35.
168. Kang X.-H. et al. Degradation of Mcl-1 through GSK-3 β Activation Regulates Apoptosis Induced by Bufalin in Non-Small Cell Lung Cancer H1975 Cells // *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* – 2017. – Vol. 41, № 5. – P. 2067–2076.
169. Cao F. et al. Degradation of MCL-1 by bufalin reverses acquired resistance to osimertinib in EGFR-mutant lung cancer // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* – 2019. – Vol. 379. – P. 114662.
170. Wu X. et al. MGMT-activated DUB3 stabilizes MCL1 and drives chemoresistance in ovarian cancer // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2019. – Vol. 116, № 8. – P. 2961–2966.
171. Kim E.Y. et al. Ursolic acid facilitates apoptosis in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts by inducing SP1-mediated Noxa expression and proteasomal degradation of Mcl-1 // *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* – 2018. – Vol. 32, № 11. – P. fj201800425R.
172. Lee E.F. et al. Conformational Changes in Bcl-2 Pro-survival Proteins Determine Their Capacity to Bind Ligands // *J. Biol. Chem. American Society for Biochemistry and Molecular Biology.* – 2009. – Vol. 284, № 44. – P. 30508.
173. Brennan M.S. et al. Humanized Mcl-1 mice enable accurate preclinical evaluation of MCL-1 inhibitors destined for clinical use // *Blood.* – 2018. – Vol. 132, № 15. – P. 1573–1583.
174. Walensky L.D. et al. A Stapled BID BH3 Helix Directly Binds and Activates BAX // *Mol. Cell.* – 2006. – Vol. 24, № 2. – P. 199–210.
175. Stewart M.L. et al. The MCL-1 BH3 helix is an exclusive MCL-1 inhibitor and apoptosis sensitizer // *Nat. Chem. Biol.* – 2010. – Vol. 6. – № 8. P. 595–601.

176. Muppidi A. et al. Rational Design of Proteolytically Stable, Cell-Permeable Peptide-Based Selective Mcl-1 Inhibitors // *J. Am. Chem. Soc.* – 2012. – Vol. 134, № 36. – P. 14734–14737.
177. Muppidi A. et al. Targeted delivery of ubiquitin-conjugated BH3 peptide-based Mcl-1 inhibitors into cancer cells // *Bioconjug. Chem.* – 2014. – Vol. 25, № 2. – P. 424–432.
178. Foight G.W. et al. Designed BH3 peptides with high affinity and specificity for targeting Mcl-1 in cells // *ACS Chem. Biol.* – 2014. – Vol. 9, № 9. – P. 1962–1968.
179. Rezaei Araghi R. et al. Rapid Optimization of Mcl-1 Inhibitors using Stapled Peptide Libraries Including Non-Natural Side Chains // *ACS Chem. Biol.* – 2016. – Vol. 11, № 5. – P. 1238–1244.
180. Rezaei Araghi R. et al. Iterative optimization yields Mcl-1-targeting stapled peptides with selective cytotoxicity to Mcl-1-dependent cancer cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2018. – Vol. 115, № 5. – P. E886–E895.
181. Cohen N.A. et al. A Competitive Stapled Peptide Screen Identifies a Selective Small Molecule that Overcomes MCL-1-Dependent Leukemia Cell Survival // *Chem. Biol.* – 2012. – Vol. 19, № 9. – P. 1175–1186.
182. Zhai D. et al. Comparison of chemical inhibitors of antiapoptotic Bcl-2-family proteins // *Cell Death Differ.* – 2006. – Vol. 13, № 8. – P. 1419–1421.
183. Champa D. et al. Obatoclax overcomes resistance to cell death in aggressive thyroid carcinomas by countering Bcl2a1 and Mcl1 overexpression // *Endocr. Relat. Cancer.* – 2014. – Vol. 21, № 5. – P. 755–767.
184. Li J., Viallet J., Haura E.B. A small molecule pan-Bcl-2 family inhibitor, GX15-070, induces apoptosis and enhances cisplatin-induced apoptosis in non-small cell lung cancer cells // *Cancer Chemother. Pharmacol.* – 2008. – Vol. 61, № 3. – P. 525–534.
185. Broecker-Preuss M. et al. Cell death induction by the BH3 mimetic GX15-070 in thyroid carcinoma cells // *J. Exp. Clin. Cancer Res.* – 2015. – Vol. 34, № 1. – P. 69.

186. Wroblewski D. et al. OBATOCLAX and ABT-737 Induce ER Stress Responses in Human Melanoma Cells that Limit Induction of Apoptosis // PLoS ONE / ed. Villunger A. – 2013. – Vol. 8, № 12. – P. e84073.
187. Basit F., Cristofanon S., Fulda S. Obatoclax (GX15-070) triggers necroptosis by promoting the assembly of the necrosome on autophagosomal membranes // Cell Death Differ. – 2013. – Vol. 20, № 9. – P. 1161–1173.
188. Bonapace L. et al. Induction of autophagy-dependent necroptosis is required for childhood acute lymphoblastic leukemia cells to overcome glucocorticoid resistance // J. Clin. Invest. – 2010. – Vol. 120, № 4. – P. 1310–1323.
189. Mallick D.J. et al. Confounding off-target effects of BH3 mimetics at commonly used concentrations: MIM1, UMI-77, and A-1210477 // Cell Death Dis. – 2019. – Vol. 10, № 3. – P. 185.
190. Ding X. et al. Targeting sphingosine kinase 2 suppresses cell growth and synergizes with BCL2/BCL-XL inhibitors through NOXA-mediated MCL1 degradation in cholangiocarcinoma // Am. J. Cancer Res. – 2019. – Vol. 9, № 3. – P. 546–561.
191. Levenson J.D. et al. Potent and selective small-molecule MCL-1 inhibitors demonstrate on-target cancer cell killing activity as single agents and in combination with ABT-263 (navitoclax) // Cell Death Dis. – 2015. – Vol. 6, № 1. – P. e1590–e1590.
192. Milani M. et al. DRP-1 is required for BH3 mimetic-mediated mitochondrial fragmentation and apoptosis // Cell Death Dis. – 2017. – Vol. 8, № 1. – P. e2552–e2552.
193. Ramsey H.E. et al. A Novel MCL1 Inhibitor Combined with Venetoclax Rescues Venetoclax-Resistant Acute Myelogenous Leukemia // Cancer Discov. – 2018. – Vol. 8, № 12. – P. 1566–1581.
194. Williams M.M. et al. Therapeutic inhibition of Mcl-1 blocks cell survival in estrogen receptor-positive breast cancers // Oncotarget. – 2019. – Vol. 10, № 52. – P. 5389–5402.

195. Algarín E.M. et al. Preclinical evaluation of the simultaneous inhibition of MCL-1 and BCL-2 with the combination of S63845 and venetoclax in multiple myeloma // *Haematologica*. – 2020. – Vol. 105, № 3. – P. e116–e120.
196. Merino D. et al. Synergistic action of the MCL-1 inhibitor S63845 with current therapies in preclinical models of triple-negative and HER2-amplified breast cancer // *Sci. Transl. Med.* – 2017. – Vol. 9, № 401. – P. eaam7049.
197. Tron A.E. et al. Discovery of Mcl-1-specific inhibitor AZD5991 and preclinical activity in multiple myeloma and acute myeloid leukemia // *Nat. Commun.* – 2018. – Vol. 9, № 1. – P. 5341.
198. Song X. et al. Mcl-1 inhibition overcomes intrinsic and acquired regorafenib resistance in colorectal cancer // *Theranostics*. – 2020. – Vol. 10, № 18. – P. 8098–8110.
199. Caenepeel S. et al. AMG 176, a Selective MCL1 Inhibitor, Is Effective in Hematologic Cancer Models Alone and in Combination with Established Therapies // *Cancer Discov.* – 2018. – Vol. 8, № 12. – P. 1582–1597.
200. Sulkshane P., Teni T. Myeloid cell leukemia-1: a formidable barrier to anticancer therapeutics and the quest of targeting it // *Explor. Target. Anti-Tumor Ther.* – 2022. – Vol. 3, № 3. – P. 278–296.
201. Roberts A.W., Wei A.H., Huang D.C.S. BCL2 and MCL1 inhibitors for hematologic malignancies // *Blood*. – 2021. – Vol. 138, № 13. – P. 1120–1136.
202. Daressy F. et al. NA1-115-7, from *Zygogynum pancheri*, is a new selective MCL-1 inhibitor inducing the apoptosis of hematological cancer cells but non-toxic to normal blood cells or cardiomyocytes // *Biomed. Pharmacother. Biomedecine Pharmacother.* – 2022. – Vol. 154. – P. 113546.
203. Tantawy S.I. et al. Mechanisms of MCL-1 Protein Stability Induced by MCL-1 Antagonists in B-Cell Malignancies // *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* – 2023. – Vol. 29, № 2. – P. 446–457.

204. Zhang H. et al. MCL-1 Inhibitor S63845 Distinctively Affects Intramedullary and Extramedullary Hematopoiesis // *Pharmaceutics*. – 2023. – Vol. 15. – № 4. P. 1085.
205. Tahir S.K. et al. Potential mechanisms of resistance to venetoclax and strategies to circumvent it // *BMC Cancer*. – 2017. – Vol. 17, № 1. – P. 399.
206. Bodo J. et al. Acquired resistance to venetoclax (ABT-199) in t(14;18) positive lymphoma cells // *Oncotarget*. – 2016. – Vol. 7, № 43. – P. 70000–70010.
207. Bolomsky A. et al. Heterogeneous modulation of Bcl-2 family members and drug efflux mediate MCL-1 inhibitor resistance in multiple myeloma // *Blood Adv.* – 2021. – Vol. 5, № 20. – P. 4125–4139.
208. Fresquet V. et al. Acquired mutations in BCL2 family proteins conferring resistance to the BH3 mimetic ABT-199 in lymphoma // *Blood*. – 2014. – Vol. 123, № 26. – P. 4111–4119.
209. Blombery P. et al. Multiple BCL2 mutations cooccurring with Gly101Val emerge in chronic lymphocytic leukemia progression on venetoclax // *Blood*. – 2020. – Vol. 135, № 10. – P. 773–777.
210. Blombery P. et al. Acquisition of the Recurrent Gly101Val Mutation in BCL2 Confers Resistance to Venetoclax in Patients with Progressive Chronic Lymphocytic Leukemia // *Cancer Discov.* – 2019. – Vol. 9, № 3. – P. 342–353.
211. Tausch E. et al. Venetoclax resistance and acquired BCL2 mutations in chronic lymphocytic leukemia // *Haematologica*. – 2019. – Vol. 104, № 9. – P. e434–e437.
212. Oliner J.D., Saiki A.Y., Caenepeel S. The Role of MDM2 Amplification and Overexpression in Tumorigenesis // *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* – 2016. – Vol. 6, № 6. – P. a026336.
213. Lane D.P., Crawford L.V. T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells // *Nature*. – 1979. – Vol. 278, № 5701. – P. 261–263.

214. Levine A.J. p53: 800 million years of evolution and 40 years of discovery // *Nat. Rev. Cancer.* – 2020. – Vol. 20, № 8. – P. 471–480.
215. Bargonetti J., Prives C. Gain-of-function mutant p53: history and speculation // *J. Mol. Cell Biol.* – 2019. – Vol. 11, № 7. – P. 605–609.
216. Howley P.M. Warts, cancer and ubiquitylation: lessons from the papillomaviruses // *Trans. Am. Clin. Climatol. Assoc.* – 2006. – Vol. 117. – P. 113–126; discussion 126–127.
217. Sun X. et al. BRD8 maintains glioblastoma by epigenetic reprogramming of the p53 network // *Nature.* – 2023. – Vol. 613, № 7942. – P. 195–202.
218. Shadfan M., Lopez-Pajares V., Yuan Z.-M. MDM2 and MDMX: Alone and together in regulation of p53 // *Transl. Cancer Res.* – 2012. – Vol. 1, № 2. – P. 88–89.
219. Karni-Schmidt O., Lokshin M., Prives C. The Roles of MDM2 and MDMX in Cancer // *Annu. Rev. Pathol.* – 2016. – Vol. 11. – P. 617–644.
220. Carter S. et al. C-terminal modifications regulate MDM2 dissociation and nuclear export of p53 // *Nat. Cell Biol.* – 2007. – Vol. 9, № 4. – P. 428–435.
221. Wade M. et al. Functional analysis and consequences of Mdm2 E3 ligase inhibition in human tumor cells // *Oncogene.* – 2012. – Vol. 31, № 45. – P. 4789–4797.
222. Chen L. et al. MDM2 recruitment of lysine methyltransferases regulates p53 transcriptional output // *EMBO J.* – 2010. – Vol. 29, № 15. – P. 2538–2552.
223. Zhao Y. et al. Small-molecule inhibitors of the MDM2-p53 protein-protein interaction (MDM2 Inhibitors) in clinical trials for cancer treatment // *J. Med. Chem.* – 2015. – Vol. 58, № 3. – P. 1038–1052.
224. Yu D.-H. et al. Targeting MDMX for Cancer Therapy: Rationale, Strategies, and Challenges // *Front. Oncol.* – 2020. – Vol. 10. – P. 1389.
225. Klein A.M. et al. The roles and regulation of MDM2 and MDMX: it is not just about p53 // *Genes Dev.* – 2021. – Vol. 35, № 9–10. – P. 575–601.

226. Zafar A., Khan M.J., Naeem A. MDM2- an indispensable player in tumorigenesis // *Mol. Biol. Rep.* – 2023. – Vol. 50, № 8. – P. 6871–6883.
227. Vassilev L.T. et al. In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2 // *Science.* – 2004. – Vol. 303, № 5659. – P. 844–848.
228. Vu B. et al. Discovery of RG7112: A Small-Molecule MDM2 Inhibitor in Clinical Development // *ACS Med. Chem. Lett.* – 2013. – Vol. 4, № 5. – P. 466–469.
229. Ray-Coquard I. et al. Effect of the MDM2 antagonist RG7112 on the P53 pathway in patients with MDM2-amplified, well-differentiated or dedifferentiated liposarcoma: an exploratory proof-of-mechanism study // *Lancet Oncol.* – 2012. – Vol. 13, № 11. – P. 1133–1140.
230. Andreeff M. et al. Results of the Phase I Trial of RG7112, a Small-Molecule MDM2 Antagonist in Leukemia // *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* – 2016. – Vol. 22, № 4. – P. 868–876.
231. Iancu-Rubin C. et al. Activation of p53 by the MDM2 inhibitor RG7112 impairs thrombopoiesis // *Exp. Hematol.* – 2014. – Vol. 42, № 2. – P. 137-145.e5.
232. Tovar C. et al. MDM2 small-molecule antagonist RG7112 activates p53 signaling and regresses human tumors in preclinical cancer models // *Cancer Res.* – 2013. – Vol. 73, № 8. – P. 2587–2597.
233. Montesinos P. et al. MIRROS: a randomized, placebo-controlled, Phase III trial of cytarabine ± idasanutlin in relapsed or refractory acute myeloid leukemia // *Future Oncol. Lond. Engl.* – 2020. – Vol. 16, № 13. – P. 807–815.
234. Mascarenhas J. et al. Oral idasanutlin in patients with polycythemia vera // *Blood.* – 2019. – Vol. 134, № 6. – P. 525–533.
235. Bykov V.J.N. et al. Restoration of the tumor suppressor function to mutant p53 by a low-molecular-weight compound // *Nat. Med.* – 2002. – Vol. 8, № 3. – P. 282–288.

236. Ali D. et al. APR-246 exhibits anti-leukemic activity and synergism with conventional chemotherapeutic drugs in acute myeloid leukemia cells // *Eur. J. Haematol.* – 2011. – Vol. 86, № 3. – P. 206–215.
237. Lambert J.M.R. et al. PRIMA-1 reactivates mutant p53 by covalent binding to the core domain // *Cancer Cell.* – 2009. – Vol. 15, № 5. – P. 376–388.
238. Bykov V.J.N. et al. Targeting of Mutant p53 and the Cellular Redox Balance by APR-246 as a Strategy for Efficient Cancer Therapy // *Front. Oncol.* – 2016. – Vol. 6. – P. 21.
239. Joerger A.C., Ang H.C., Fersht A.R. Structural basis for understanding oncogenic p53 mutations and designing rescue drugs // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2006. – Vol. 103, № 41. – P. 15056–15061.
240. de Thé H., Pandolfi P.P., Chen Z. Acute Promyelocytic Leukemia: A Paradigm for Oncoprotein-Targeted Cure // *Cancer Cell.* – 2017. – Vol. 32, № 5. – P. 552–560.
241. Kocik J. et al. Helping the Released Guardian: Drug Combinations for Supporting the Anticancer Activity of HDM2 (MDM2) Antagonists // *Cancers.* – 2019. – Vol. 11, № 7. – P. 1014.
242. Chen J. The Cell-Cycle Arrest and Apoptotic Functions of p53 in Tumor Initiation and Progression // *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* – 2016. – Vol. 6, № 3. – P. a026104.
243. Erba H.P. et al. Phase 1b study of the MDM2 inhibitor AMG 232 with or without trametinib in relapsed/refractory acute myeloid leukemia // *Blood Adv.* – 2019. – Vol. 3, № 13. – P. 1939–1949.
244. Michaelis M. et al. Adaptation of cancer cells from different entities to the MDM2 inhibitor nutlin-3 results in the emergence of p53-mutated multi-drug-resistant cancer cells // *Cell Death Dis.* – 2011. – Vol. 2, № 12. – P. e243.
245. Berberich A. et al. Targeting Resistance against the MDM2 Inhibitor RG7388 in Glioblastoma Cells by the MEK Inhibitor Trametinib // *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* – 2019. – Vol. 25, № 1. – P. 253–265.

246. Deben C. et al. Characterization of acquired nutlin-3 resistant non-small cell lung cancer cells // *Cancer Drug Resist.* Alhambra Calif. – 2021. – Vol. 4, № 1. – P. 233–243.
247. Lestini B.J. et al. Mcl1 downregulation sensitizes neuroblastoma to cytotoxic chemotherapy and small molecule Bcl2-family antagonists // *Cancer Biol. Ther.* – 2009. – Vol. 8, № 16. – P. 1587–1595.
248. Senichkin V.V. et al. Bak and Bcl-xL Participate in Regulating Sensitivity of Solid Tumor Derived Cell Lines to Mcl-1 Inhibitors // *Cancers.* – 2022. – Vol. 14, № 1. – P. 181.
249. Ku B. et al. Evidence that inhibition of BAX activation by BCL-2 involves its tight and preferential interaction with the BH3 domain of BAX // *Cell Res.* – 2011. – Vol. 21, № 4. – P. 627–641.
250. Sazonova E.V. et al. Cancer Drug Resistance: Targeting Proliferation or Programmed Cell Death // *Cells.* – 2024. – Vol. 13, № 5. – P. 388.
251. Gottesman M.M., Pastan I., Ambudkar S.V. P-glycoprotein and multidrug resistance // *Curr. Opin. Genet. Dev.* – 1996. – Vol. 6, № 5. – P. 610–617.
252. Dong J. et al. Strategies to overcome cancer multidrug resistance (MDR) through targeting P-glycoprotein (ABCB1): An updated review // *Pharmacol. Ther.* – 2023. – Vol. 249. – P. 108488.
253. Van Goethem A. et al. Dual targeting of MDM2 and BCL2 as a therapeutic strategy in neuroblastoma // *Oncotarget.* – 2017. – Vol. 8, № 34. – P. 57047–57057.
254. Tweddle D.A. et al. p53 cellular localization and function in neuroblastoma: evidence for defective G(1) arrest despite WAF1 induction in MYCN-amplified cells // *Am. J. Pathol.* – 2001. – Vol. 158, № 6. – P. 2067–2077.
255. Leroy B. et al. Analysis of TP53 Mutation Status in Human Cancer Cell Lines: A Reassessment // *Hum. Mutat.* – 2014. – Vol. 35, № 6. – P. 756–765.

256. Al-Ghabkari A., Narendran A. *In Vitro* Characterization of a Potent p53-MDM2 Inhibitor, RG7112 in Neuroblastoma Cancer Cell Lines // *Cancer Biother. Radiopharm.* – 2019. – Vol. 34, № 4. – P. 252–257.
257. Ajay A.K., Meena A.S., Bhat M.K. Human papillomavirus 18 E6 inhibits phosphorylation of p53 expressed in HeLa cells // *Cell Biosci.* – 2012. – Vol. 2, № 1. – P. 2.
258. Van Maerken T. et al. Pharmacologic activation of wild-type p53 by nutlin therapy in childhood cancer // *Cancer Lett.* – 2014. – Vol. 344, № 2. – P. 157–165.
259. Bierbrauer A. et al. A direct comparison of selective BH3-mimetics reveals BCL-XL, BCL-2 and MCL-1 as promising therapeutic targets in neuroblastoma // *Br. J. Cancer.* – 2020. – Vol. 122, № 10. – P. 1544–1551.
260. Bazanov D.R. et al. Synthetic Design and Biological Evaluation of New p53-MDM2 Interaction Inhibitors Based on Imidazoline Core // *Pharm. Basel Switz.* – 2022. – Vol. 15, № 4. – P. 444.
261. Pervushin N.V. et al. BH3-mimetics or DNA-damaging agents in combination with RG7388 overcome p53 mutation-induced resistance to MDM2 inhibition // *Apoptosis.* – 2024. – Vol. 29, № 11-12 – P. 2197–2213.
262. Aziz M.H., Shen H., Maki C.G. Acquisition of p53 mutations in response to the non-genotoxic p53 activator Nutlin-3 // *Oncogene.* – 2011. – Vol. 30, № 46. – P. 4678–4686.
263. Michaelis M. et al. Reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance by the murine double minute 2 antagonist nutlin-3 // *Cancer Res.* – 2009. – Vol. 69, № 2. – P. 416–421.
264. Tanaka T., Watanabe M., Yamashita K. Potential therapeutic targets of TP53 gene in the context of its classically canonical functions and its latest non-canonical functions in human cancer // *Oncotarget.* – 2018. – Vol. 9, № 22. – P. 16234–16247.

265. Elsaid A. et al. Genetic polymorphisms of TP53 Arg72Pro and Pro47Ser among Egyptian patients with colorectal carcinoma // Arch. Physiol. Biochem. – 2019. – Vol. 125, № 3. – P. 255–262.
266. Tian X. et al. The association between the TP53 Arg72Pro polymorphism and colorectal cancer: An updated meta-analysis based on 32 studies // Oncotarget. – 2017. – Vol. 8, № 1. – P. 1156–1165.
267. McLure K.G., Lee P.W. How p53 binds DNA as a tetramer // EMBO J. – 1998. – Vol. 17, № 12. – P. 3342–3350.
268. Timofeev O., Stiewe T. Rely on Each Other: DNA Binding Cooperativity Shapes p53 Functions in Tumor Suppression and Cancer Therapy // Cancers. – 2021. – Vol. 13, № 10. – P. 2422.
269. de Andrade K.C. et al. The TP53 Database: transition from the International Agency for Research on Cancer to the US National Cancer Institute // Cell Death Differ. – 2022. – Vol. 29, № 5. – P. 1071–1073.
270. Tran H.C. et al. Oxaliplatin and Doxorubicin for relapsed or refractory high-risk neuroblastoma // Pediatr. Hematol. Oncol. – 2015. – Vol. 32, № 1. – P. 26–31.
271. Favreau-Lessard A.J. et al. Systemic and cardiac susceptibility of immune compromised mice to doxorubicin // Cardio-Oncol. Lond. Engl. – 2019. – Vol. 5. – P. 2.
272. Bazanov D.R. et al. Sulfonamide derivatives of cis-imidazolines as potent p53-MDM2/MDMX protein-protein interaction inhibitors // Med. Chem. Res. – 2021. – Vol. 30, № 12. – P. 2216–2227.
273. Bazanov D.R. et al. 2,4,5-Tris(alkoxyaryl)imidazoline derivatives as potent scaffold for novel p53-MDM2 interaction inhibitors: Design, synthesis, and biological evaluation // Bioorg. Med. Chem. Lett. – 2019. – Vol. 29, № 16. – P. 2364–2368.
274. Amaral M.V.S. et al. Establishment of Drug-resistant Cell Lines as a Model in Experimental Oncology: A Review // Anticancer Res. – 2019. – Vol. 39, № 12. – P. 6443–6455.

275. McDermott M. et al. In vitro Development of Chemotherapy and Targeted Therapy Drug-Resistant Cancer Cell Lines: A Practical Guide with Case Studies // *Front. Oncol.* – 2014. – Vol. 4. – P. 40.
276. Tippett V.L. et al. The strategy and clinical relevance of in vitro models of MAP resistance in osteosarcoma: a systematic review // *Oncogene.* – 2023. – Vol. 42, № 4. – P. 259–277.
277. Abdul Rahman S.F. et al. Co-inhibition of BCL-XL and MCL-1 with selective BCL-2 family inhibitors enhances cytotoxicity of cervical cancer cell lines // *Biochem. Biophys. Rep.* – 2020. – Vol. 22. – P. 100756.
278. Pervushin N.V. et al. Cisplatin Resistance and Metabolism: Simplification of Complexity // *Cancers.* – 2024. – Vol. 16, № 17. – P. 3082.
279. Alvarado-Ortiz E. et al. Mutant p53 Gain-of-Function: Role in Cancer Development, Progression, and Therapeutic Approaches // *Front. Cell Dev. Biol.* – 2020. – Vol. 8. – P. 607670.