

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М. В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Шафиков Радик Радикович

**Структурно-функциональная характеристика
лигандов маркера рака простаты GSPH и анализ
регуляции экспрессии кодирующего его гена *FOLH1***

1.5.3 «молекулярная биология»

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени

кандидата химических наук

Москва – 2022

Работа выполнена на кафедре химии природных соединений химического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова.

Научный руководитель

– **Скворцов Дмитрий Александрович**
кандидат химических наук

Официальные оппоненты

– **Милаева Елена Рудольфовна**
доктор химических наук, профессор,
заведующая кафедрой медицинской химии и
тонкого органического синтеза Химического
факультета МГУ имени М.В.Ломоносова

– **Митькевич Владимир Александрович**
доктор биологических наук,
член-корреспондент РАН,
главный научный сотрудник ФГБУН
Института молекулярной биологии им. В.А.
Энгельгардта РАН

– **Мензоров Алексей Гаврилович**
кандидат биологических наук,
ведущий научный сотрудник
сектора клеточных коллекций ФГБУН
Федерального исследовательского центра
Институт цитологии и генетики СО РАН.

Защита диссертации состоится «6» декабря 2022 г. в 16 ч. 30 мин. на заседании диссертационного совета МГУ.014.2 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 40, НИИ ФХБ, аудитория 501.

E-mail: agapkina@belozersky.msu.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27). С информацией о организации защиты и с диссертацией в электронном виде можно ознакомиться на сайте ИАС «ИСТИНА»: <https://istina.msu.ru/dissertations/503171324/>

Автореферат разослан «__» ноября 2022 г.

Учёный секретарь

диссертационного совета,

кандидат химических наук



Агапкина Ю.Ю.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Рак простаты являлся вторым по распространенности типом рака среди мужчин в 2020 году. В диагностике и разработке терапии опухоли простаты используются различные маркеры: кислая фосфатаза простаты PAP, простата-специфичный антиген PSA (KLK3), калликреин KLK2, трансформирующий фактор роста бета TGF- β 1, интерлекин IL-6, синтаза жирных кислот FAS, ранний антиген рака простаты ERCA, глутаматкарбоксихептидаза II GCPH. Они различаются присутствием в простате и крови, методикой детекции, использованием для различных видов диагностики и применимостью для адресной доставки терапевтических молекул.

Среди рассматриваемых маркерных белков, фермент GCPH, кодируемый геном *FOLH1*, является мишенью для разработки новых методов интраоперационной онкодиагностики и адресной доставки терапевтических молекул в опухоль простаты, благодаря специфичности экспрессии и трансмембранной локализации в клетке. Структура цинк-содержащего каталитического центра GCPH известна, и на основании этого в литературе описаны разные типы лигандов, содержащих цинк-связывающие группы. Особо интересны лиганды, содержащие малополярные и несклонные к окислению уреидо-группы, соединенные с остатками глутамата и лизина. Для них описан ряд модификаций различными группировками, способными взаимодействовать с близким к каталитическому центру GCPH гидрофобным карманом или дальним арил-связывающим участком фермента. Однако, систематического исследования лигандов с сочетаниями таких модификаций ранее не проводилось.

Высокая экспрессия гена *FOLH1* тканеспецифична: наибольший уровень его экспрессии наблюдается в опухоли простаты, в простате, в проксимальных канальцах почек и некоторых отделах двенадцатиперстной кишки. Установление белков-регуляторов экспрессии *FOLH1* позволит лучше понять каскады, участвующие в обеспечении опухоли- и тканеспецифичности, и рассматривать ключевые белки этих каскадов в качестве мишеней для диагностики и терапии заболеваний.

Структурно-функциональная характеристика лигандов белка GCPH и анализ возможных путей регуляции экспрессии кодирующего его гена *FOLH1* представляются важной задачей.

Цели и задачи исследования

Целями данной работы являются оптимизация структуры лигандов белка GCPH и их конъюгатов с флуоресцентными и цитотоксичными молекулами, нацеленных на клетки рака простаты, и обнаружение регуляторов, обеспечивающих высокую экспрессию гена *FOLH1* в простате и опухоли простаты. Для достижения этих целей были поставлены следующие задачи:

- 1) Исследовать структурно-функциональную зависимость новых низкомолекулярных лигандов GСРІІ для улучшения их взаимодействия с мишенью.
- 2) Оценить *in vitro* способность низкомолекулярных лигандов GСРІІ, конъюгированных с флуоресцентными молекулами, окрашивать клетки, экспрессирующие GСРІІ.
- 3) Исследовать цитотоксичность лигандов GСРІІ, конъюгированных с флуоресцентными молекулами или монометил ауристатином Е.
- 4) Идентифицировать потенциальные регуляторы экспрессии *FOLH1*.

Объект исследования

Объектами исследования в настоящей работе являются белок GСРІІ человека и кодирующий его ген *FOLH1*.

Предмет исследования

Предметами исследования в представленной работе являются свойства лигандов маркера опухолевых клеток простаты GСРІІ и регуляция экспрессии кодирующего его гена *FOLH1*.

Научная новизна исследования

Исследованные в данной работе лиганды GСРІІ являются ингибиторами этого фермента, поэтому для оценки эффективности их взаимодействия с GСРІІ мы определяли значения константы ингибирования (K_i). Были определены K_i фермента GСРІІ для более, чем сорока лигандов с различными комбинациями заместителей, синтезированных нашими коллегами с кафедры органической химии химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова. Для исследований, приведенных в настоящей работе, были использованы данные о структуре фармакофорного кармана фермента GСРІІ. Все соединения были разбиты на три "поколения" в зависимости от исследуемых модификаций (см. рис. 1, таблицы 1-3). Для молекул поколения "А" было показано, что, как правило, наиболее выгодной конфигурацией дипептидного фрагмента линкера является (L,L), поскольку такие лиганды имеют наименьшее значение K_i . Для лигандов поколения "В" показано, что низкие значения K_i имеют лиганды, содержащие атом СІ в *мета*-положении арильного фрагмента Р1 и атомы СІ или Вг в *пара*-положении арильного фрагмента Р1. Лиганды, в которых эти заместители сочетаются с (L,L) конфигурацией дипептидного фрагмента линкера, более эффективны. В поколении "С" наиболее эффективными оказались лиганды, содержащие карбоксильную группу в *пара*-положении арильного фрагмента Р1.

В настоящей работе были исследованы конъюгаты выбранных в первой части работы лигандов фермента GСРІІ с цитотоксическими и флуоресцентными молекулами. Для этих

соединений были продемонстрированы специфичные взаимодействия с опухолевыми клетками простаты, экспрессирующими GСPII. В частности, для конъюгатов лигандов GСPII с монометил ауристатином E были определены значения CC_{50} , соответствующие концентрации лиганда, при которой гибнет половина клеток, а для флуоресцентных производных продемонстрирована высокая эффективность окрашивания GСPII-экспрессирующих клеток.

Несмотря на привлекательность белка GСPII как маркера опухоли простаты, регуляция его экспрессии изучена недостаточно. В литературе не представлено систематического исследования возможных транс-регуляторов экспрессии *FOLH1*. В данной работе проанализирован возможный регулон *FOLH1* с использованием нескольких экспериментальных и *in silico* подходов. Валидация транскрипционного фактора MAZ как активатора транскрипции *FOLH1* в клетках опухоли простаты 22Rv1 позволяет утверждать, что предложенная в данной работе стратегия применима для поиска регуляторов экспрессии *FOLH1*.

Научная и практическая значимость исследования

На настоящий момент в числе лигандов белка GСPII, наиболее перспективных по совокупности ингибирующих и фармакофорных свойств, рассматриваются соединения, содержащие уреидо-группы, соединенные с остатками глутамата и лизина. В литературе описаны модификации этих лигандов с различными заместителями, способными взаимодействовать с близким к каталитическому центру GСPII гидрофобным карманом или дальним арил-связывающим участком фермента. Нами выполнено систематическое исследование новых лигандов, содержащих комбинации таких модификаций.

С использованием полученных в ходе настоящей работы данных о биологической активности соединений подана заявка на патент. Специфичность к GСPII является ключевой особенностью лигандов, синтезированных нашими коллегами с кафедры органической химии химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, для направленной доставки молекулярных фрагментов для диагностики и терапии.

Создание эффективных лигандов GСPII необходимо не только в клиническом аспекте: конъюгаты этих лигандов с флуоресцентными молекулами могут помочь в поиске неизвестных ранее регуляторов транскрипции *FOLH1* в опухоли простаты. Окрашивание флуоресцентным лигандом **B15-Cy5** экспрессирующих GСPII клеток позволило отбирать в ходе сортировки те клетки, где экспрессия гена *FOLH1* изменилась из-за нокаута потенциального регулятора. Полученные в настоящей работе с помощью различных *in silico* и экспериментальных подходов данные о вероятных регуляторах экспрессии *FOLH1* могут быть использованы для поиска

регуляторов опухолевого процесса и для понимания тканеспецифичной регуляции в нормальных тканях простаты.

Методология диссертационного исследования

Для решения поставленных задач в представленной работе применялись современные методы и подходы, а также использовались собственные разработки автора.

Исследование проводилось на клеточных линиях человека различного происхождения (LNCaP, 22Rv1, PC-3, A549, VA-13, MCF-7, HEK293T).

Исследование ингибирующих свойств лигандов GСРII и их конъюгатов с флуоресцентными молекулами проведено с помощью теста ингибирования GСРII *in vitro*. Значение константы ингибирования K_i использовалось в качестве параметра для оценки эффективности взаимодействия лигандов с GСРII. Оно определялось по уравнению Ченга-Пруссоффа: $K_i = IC_{50}/(1+S/K_m)$, где IC_{50} – экспериментально полученная концентрация полумаксимального ингибирования GСРII в тесте ферментативной активности, S – концентрация NAAG, субстрата GСРII; значение K_m взято из литературы.

Цитотоксические свойства лигандов GСРII оценены в клеточных линиях человека различной этиологии посредством МТТ-теста.

Для оценки селективности флуоресцентных лигандов проведено окрашивание ими клеток, экспрессирующих и не экспрессирующих GСРII, с последующей проточной цитофлуориметрией или флуоресцентной микроскопией. Предложен метод отслеживания уровня экспрессии *FOLH1* по флуоресцентному сигналу от низкомолекулярного флуоресцентного лиганда, связанного с GСРII.

Потенциальные регуляторы экспрессии *FOLH1* выбраны посредством скрининга с использованием коммерчески доступной полногеномной библиотеки нокаутов Gecko v2, анализа баз данных нокадаунов и корреляционного анализа экспрессии генов в опухолевых клетках простаты. Для скрининга создана клеточная линия LNCaP-Cas9. Проводилась сборка лентивирусов в клетках HEK293T и трансдукция линии LNCaP-Cas9. После селекции на антибиотике клетки были инкубированы с флуоресцентным лигандом GСРII **B15-Cy5**, произведен отбор клеток с изменившейся экспрессией *FOLH1* на проточном цитометре. Для индивидуальной проверки генов регуляторов были осуществлены их нокадаун и суперэкспрессия. Суперэкспрессия генов предполагаемых регуляторов проводилась с помощью системы транспозонов Sleeping Beauty в клеточных линиях рака простаты LNCaP, 22Rv1, PC-3. Влияние нокадауна или суперэкспрессии потенциальных регуляторов на экспрессию гена *FOLH1* оценивалось с помощью ПЦР в реальном времени.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Константы ингибирования фермента GСPII исследуемыми низкомолекулярными лигандами находятся в наномолярном диапазоне.
2. По сравнению с монометил ауристатином E, цитотоксичность его конъюгата с лигандом GСPII **V15** оказалась ниже для клеток, не экспрессирующих GСPII, при общем снижении цитотоксичности *in vitro*.
3. Флуоресцентный лиганд **V15-Cy5** имеет высокую специфичность к GСPII-экспрессирующим клеткам опухоли простаты и низкую цитотоксичность.
4. Флуоресцентный сигнал от лиганда **V15-Cy5**, связанного с GСPII, отражает уровень экспрессии *FOLH1* и может быть использован для поиска потенциальных регуляторов экспрессии *FOLH1* при скрининге библиотеки нокаутов.
5. Транскрипционный фактор MAZ является активатором транскрипции гена *FOLH1*.

Апробация работы

Основные результаты диссертации докладывались на 5-ти конференциях и научных школах различного уровня (в том числе всероссийских и международных), а именно:

1. VII съезд биохимиков, молекулярных биологов и физиологов России (Сочи, 2022, сертификат победителя за доклад)
2. Всероссийская научная конференции "Марковниковские чтения: органическая химия от Марковникова до наших дней" Школа-конференция молодых ученых «Органическая химия: Традиции и Современность» (Сочи, 2022)
3. Кост-2021. Всероссийский конгресс по химии гетероциклических соединений (Сочи, 2021)
4. 26th EFMC International Symposium on Medicinal Chemistry (EFMC-ISMC-2021), (Виртуальная конференция, Швейцария, 2021)
5. Всероссийской научной конференции "Марковниковские чтения: органическая химия от Марковникова до наших дней", (Москва, 2020)

Публикации

По теме диссертации опубликовано 8 печатных работ, в том числе 4 статьи в рецензируемых научных журналах, индексируемых в базах данных Scopus и Web of Science. Была подана совместная с группой химического синтеза (Мачулкин А.Э., Успенская А.А. и др.) заявка на патент, основанная в значительной степени на полученных в ходе настоящей работы данных.

Личный вклад автора

Все экспериментальные данные, приведенные в рамках диссертационного исследования, за исключением *in vivo* исследований, получены лично автором или при его непосредственном участии.

Автором проведено исследование ингибирующих свойств лигандов GСРII и оценена их цитотоксичность на клеточных линиях различной этиологии. Совместно с Успенской А.А. выполнен анализ связи структура-активность лигандов GСРII. Автором выполнено окрашивание клеток флуоресцентными лигандами GСРII, проточная цитофлуориметрия и флуоресцентная микроскопия. Шафиковым Р.Р. предложен метод оценки уровня экспрессии *FOLH1* по флуоресцентному сигналу от связанного с GСРII флуоресцентного лиганда.

В части, посвященной поиску регуляторов экспрессии *FOLH1*, все экспериментальные процедуры выполнены автором лично либо при его непосредственном участии: ведение культур, проведение клонирований для суперэкспрессии транскрипционных факторов (совместно со Скворцовым Д.П.), создание клеточных линий с суперэкспрессией предполагаемых регуляторов экспрессии *FOLH1*, проверка их посредством ПЦР в реальном времени. Автор провел анализ баз данных нокдаунов, корреляционный анализ экспрессии в образцах опухоли простаты, нормальных тканях простаты и клеточных линиях. Подготовка вирусов с библиотекой последовательностей, кодирующих гидовые РНК для нокаута, заражение клеток, отбор и их окрашивание **B15-Cy5** выполнены автором самостоятельно. Сортировка клеток на проточном цитометре выполнена совместно с М.П.Рубцовой. Подготовка образцов для секвенирования и анализ результатов скрининга выполнены автором самостоятельно.

Личный вклад автора в проведённое исследование заключается также в сборе и анализе литературных данных, постановке задач, планировании экспериментов, анализе и оформлении полученных результатов, подготовке научных статей и в представлении результатов на научных конференциях.

Структура и объём диссертации

Диссертация изложена на 110 страницах и состоит из следующих разделов: «Введение», «Обзор литературы», «Экспериментальная часть», «Результаты», «Обсуждение результатов», «Выводы» и «Список литературы». Работа содержит 13 таблиц и 21 рисунок. Библиография включает 131 источник литературы.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Анализ ингибирующих свойств лигандов GСРІІ

Карман, в котором связывается лиганд, в структуре белка GСРІІ схематически представлен на рис.1. Он содержит каталитический центр CS (рис. 1С), участки связывания субстрата S1 (рис. 1D) и S1' (рис. 1E), а также арен-связывающий участок ABS (Рис. 1F). Большинство изученных низкомолекулярных лигандов белка GСРІІ являются миметиками природного субстрата – N-ацетил-аспартил-глутамата (NAAG). Известны ключевые структурные элементы лигандов, важные для взаимодействия с GСРІІ и его ингибирования (рис. 1B): цинк-связывающая группа, мотивы P1' и P1 для некоторых лигандов. Цинк-связывающая группа — это фрагмент лиганда, представляющий собой негидролизуемый структурный аналог пептидной связи NAAG, взаимодействующий с каталитическим центром, в структуре которого находятся атомы цинка. P1' часть большинства лигандов представляет собой - остаток глутамата, взаимодействующий с S1' карманом фермента, природным карманом распознавания этой аминокислоты в белке. Часть P1 лигандов может быть вариабельной: в основном она состоит из производных аминокислот, которые улучшают связывание с карманом S1 за счет своей α -карбоксильной группы. Эти лиганды могут содержать спейсеры с дополнительным фрагментом (AR_{P1}), распознающим гидрофобную поверхность сайта S1. При этом ключевым вопросом становится влияние заместителей, обеспечивающих дополнительное связывание в S1 и ABS сайтах и играющих роль линкера для используемой в качестве "нагрузки" диагностической или терапевтической молекулы. Новые лиганды GСРІІ основаны на известном мотиве L-глутамат-мочевина-L-лизин, элементы которого эффективно связываются в участке S1' и каталитическом центре (рис. 1B). Поэтому варьировались только фрагменты лигандов GСРІІ, взаимодействующие с участками S1 и ABS. Используемые в исследовании соединения были разбиты на три поколения. В каждом поколении лигандов изучался вклад модификаций, влияющих на связывание отдельных структурных элементов белка GСРІІ (рис. 1B), в значение K_i .

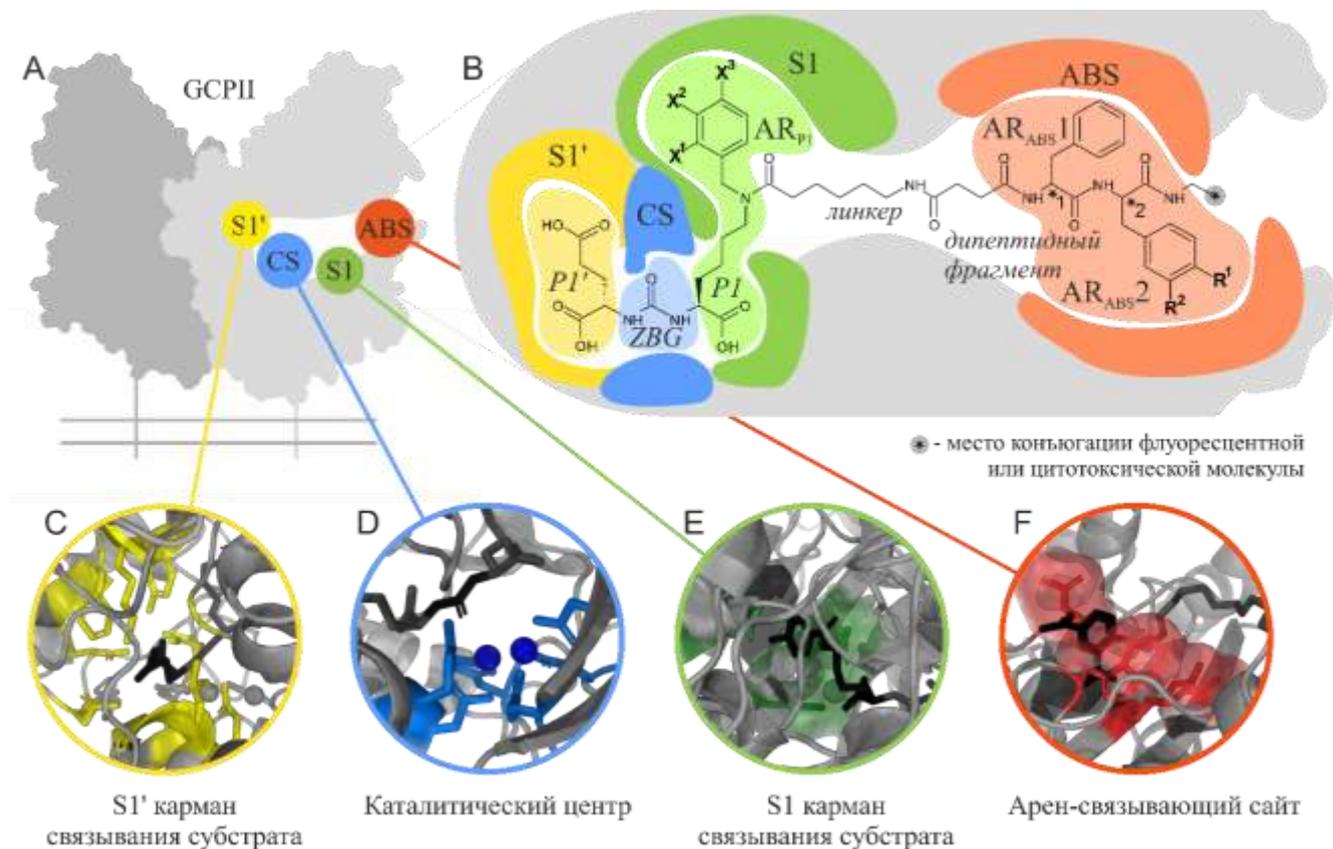


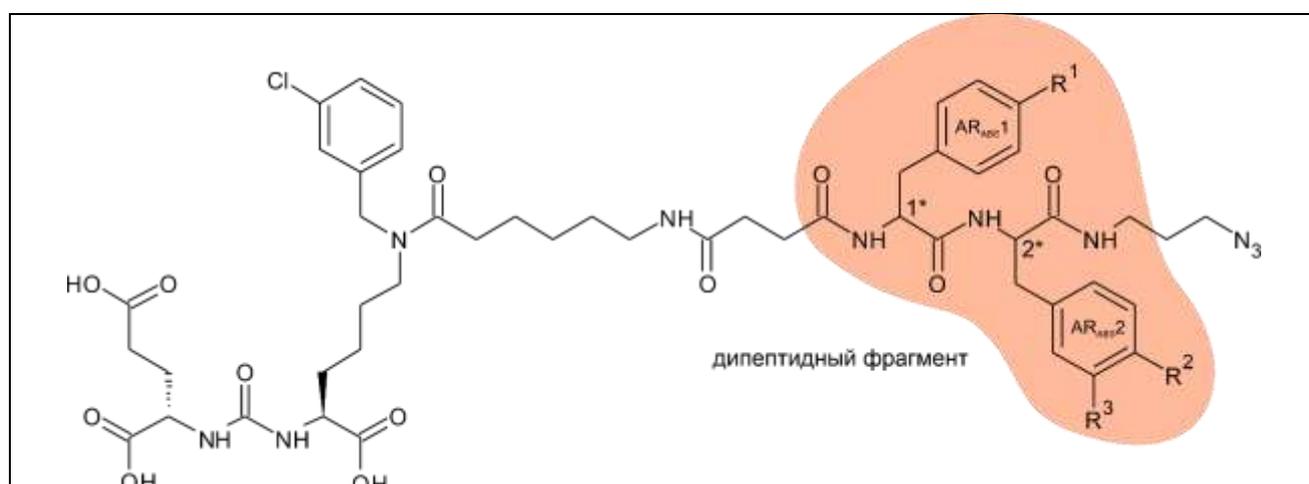
Рис. 1. Структурные элементы GCP II и ожидаемое расположение лигандов. **А.** Четыре основных участка связывания лиганда внутри GCP II. **В.** Структура лиганда с варьируемыми заместителями и его расположение относительно участков связывания в GCP II. Показаны четыре основные части лиганда. PI' мотив обычно представляет собой глутамат и заполняет карман распознавания субстрата S1'. Негидролизуемая цинк-связывающая группа (ZBG) взаимодействует с каталитическим сайтом CS. Фрагмент PI лиганда взаимодействует с сайтом S1, ароматическая часть AR_{PI} может взаимодействовать с гидрофобным аргининовым трактом в S1. Ароматические фрагменты AR_{ABS1} и AR_{ABS2} необходимы для взаимодействия с ABS. *1 и *2 – хиральные атомы дипептидного фрагмента линкера; * в сером круге обозначает место конъюгации с флуоресцентной или цитотоксической молекулой; **С.** S1' - участок распознавания субстрата, связывающий глутамат или глутамат-подобный фрагмент субстрата (PDB ID: 3D7H); **Д.** CS - каталитический сайт (PDB ID: 3D7H); **Е.** S1 - участок распознавания субстрата, содержащий аргининовый тракт (PDB ID: 3D7H); **Ф.** ABS - арен-связывающий сайт (PDB ID: 2XEI). Приведены идентификаторы Protein Data Bank. Аминокислоты, значимые для связывания молекул лигандов, окрашены, а структуры лигандов показаны темно-серым цветом.

Для оценки вклада взаимной ориентации арильных групп AR_{ABS1} и AR_{ABS2} дипептидного фрагмента линкера, позволяющей усилить связывание лиганда с GCP II, было проанализировано синтезированное нашими коллегами поколение А лигандов GCP II (таблица

1). В серии энантиомеров **A2-A5** лиганд **A2** с конфигурацией (D,D) имел меньшее значение K_i , чем **A3** с конфигурацией (L,L), однако оба этих лиганда имели K_i значительно ниже, чем **A4** и **A5** с (L,D) и (D,L) конфигурациями. В серии с гидроксигруппой в *meta*-положении AR_{ABS2} **A1**, **A6**, **A7**, **A8**, в которой реализованы все комбинации энантиомеров (D,L) в **A8** ($K_i = 137 \pm 31$ нМ), (L,D) в **A7** ($K_i = 111 \pm 18$ нМ) и (D,D) в **A6** ($K_i = 85 \pm 45$ нМ) являлись значительно менее выгодными, чем (L,L) в **A1** ($K_i = 2,3 \pm 0,6$ нМ). В отличие от небольшого различия K_i для **A2** и **A3**, где **A2** с конфигурацией (D,D) немного лучше, чем **A3** с (L,L), внесение гидроксигруппы, с одной стороны, уменьшило K_i для лиганда **A1** с конфигурацией (L,L), с другой – значительно ухудшило лиганд **A6** с (D,D).

Таким образом, замещение в *para*-позиции AR_{ABS2} атома водорода на гидроксильную группу меняло паттерн значений K_i для разных конфигураций дипептидного фрагмента. Внесение атома Br в *meta*-положение AR_{ABS2} в дополнение к гидроксигруппе в *para*-положении позволило уменьшить K_i лиганда с (D,D) конфигурацией дипептидного фрагмента (**A6** имеет $K_i = 85 \pm 45$ нМ, а его *para*-Br-замещенное производное **A10** имеет $K_i = 28 \pm 16$ нМ), но значительно ухудшило лиганд с (L,L)-конфигурацией (**A1** имеет $K_i = 2,3 \pm 0,6$ нМ, а его *para*-Br-замещенное производное **A12** имеет $K_i = 143 \pm 35$ нМ). При анализе лигандов GCP II поколения А оказалась важна комбинация всех модификаций, т.к. разные заместители арильных групп AR_{ABS2} дипептидного фрагмента и арильной группы AR_{P1} фрагмента P1 в силу природы заместителей и положения замещения меняют соотношения K_i для всех четырех энантиомеров. Показано, что энантиомеры (D,L) и (L,D) имеют большие значения K_i вне зависимости от рассмотренных заместителей AR_{ABS2} . По этой причине было решено отказаться от использования этих энантиомеров при дизайне следующих поколений лигандов GCP II.

Таблица 1. Влияние конфигурации дипептидного фрагмента линкера в поколении А лигандов GCP II.



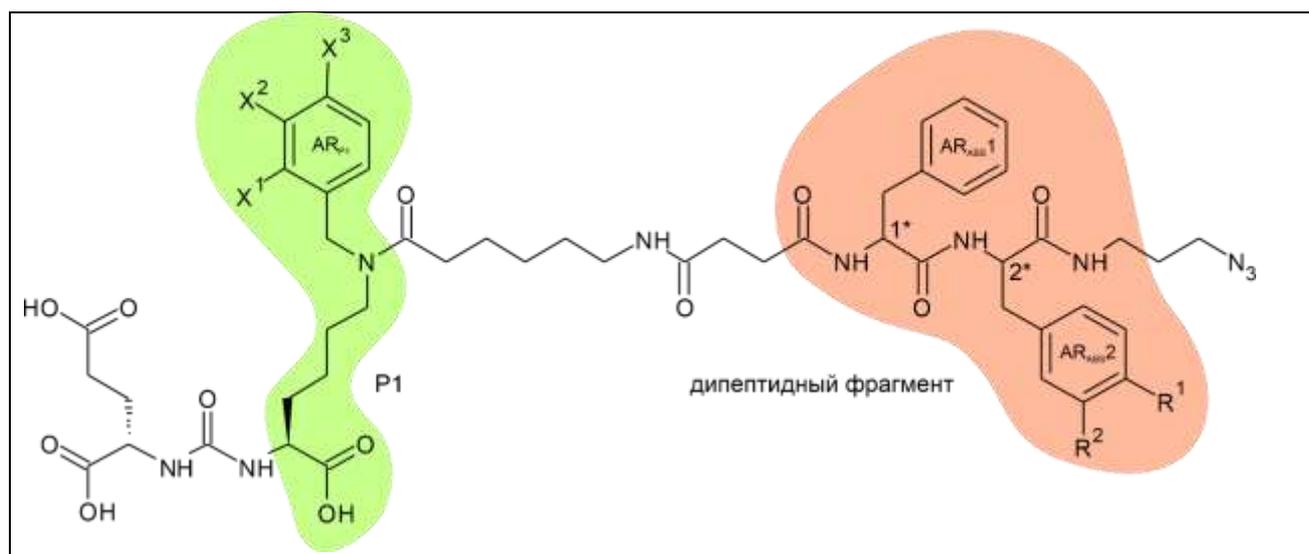
#	AR_{ABS1}		AR_{ABS2}			K_i , нМ
	*1	R^1	*2	R^3	R^4	
A1	L	H	L	OH	H	$2,4 \pm 0,6$

Продолжение таблицы 1.

A2	D		D	H		6±2
A3	L		L	H		9±3
A4	L		D	H		3±4
A5	D		L	H		50±10
A6	D		D	OH		85±45
A7	L		D	OH		110±20
A8	D		L	OH		137±31
A9	D	OH	L	H		80±10
A10	D	H	D	OH	Br	30±16
A11	L		L	H	NO ₂	100±10
A12	L		L	OH	Br	140±40
A13	L		L	OH	OH	600±100

Варьирование ориентации дипептидного фрагмента линкера, заместителей и позиций замещения в AR_{P1} и AR_{ABS2} в лигандах GCP_{II} поколения В (таблица 2) продемонстрировало невозможность строгого предсказания вклада конкретной модификации в ингибирование GCP_{II}. Тем не менее, существуют зависимости структура-активность для лигандов GCP_{II}, согласующиеся с литературными данными. Было показано, что лиганды GCP_{II} с (L,L) конфигурацией дипептидного фрагмента линкера имеют меньшие значения K_i, чем с (D,D), поэтому для дальнейших исследований флуоресцентных и цитотоксических лигандов выбран лиганд с (L,L)-конфигурацией. Так, взаимная ориентация заместителей в **B2, B3, B5, B7, B11, B13, B15, B17, B18, B21** наиболее благоприятна, когда повторяет структуру **B2**, т.е. L- AR_{ABS1}, L-AR_{ABS2}: **B11** значительно лучше, чем **B9, B15** - чем **B14, B21** - чем **B20**. Для (L,L) лигандов GCP_{II} Cl в *para*-положении AR_{P1} и Cl или Br в *meta*-положении AR_{P1} позволяют уменьшить значение K_i. Среди лигандов GCP_{II} с замещенными галогенами ароматическими фрагментами AR_{P1} низкие K_i наблюдаются у лигандов с Cl в *meta*-положении AR_{P1} (**B12, B13, B15**) и Cl (**B3, B5, B6**) или Br (**B8, B11**) в *para*-положении AR_{P1}.

Таблица 2. Влияние галоген- и гидрокси-заместителей фрагментов AR_{P1} и AR_{ABS2} в поколении В лигандов GCPII.



#	AR_{P1}			AR_{ABS1}	AR_{ABS2}		K_i , нМ		
	X^1	X^2	X^3	1^*	2^*	R^1		R^2	
B1	$AR_{P1} = H$			L	L	H	H	74±18	
B2	H	H	H	L	L			2,9±0,7	
B3			Cl	L	L			6±3	
B4			D	D	23±10				
B5			L	L	OH			5±2,6	
B6			D	D	OH			2,8±1,4	
B7			Br	L	L			H	5,2±1,4
B8				D	D	H	33±10		
B9				D	D	OH	325±287		
B10				D	D	OH	Br	9±5	
B11				L	L	OH		H	1,8±0,6
B12				Cl	H	D		D	H
B13			L			L	H	3,9±1,2	
B14			D			D	OH	11±4	
B15			L			L	OH	0,9±0,3	
B16			D			D	OH	Br	8±5
B17	F	H	Cl	L	L	H	H	4±2	
B18	H			D	D	H		7±2	
B19				D	D	H		30 ±10	
B20				D	D	OH		11±7	
B21				L	L	OH		6±2	

Введение гидроксильной группы в *para*-положение AR_{ABS2} имело разнонаправленные эффекты. Соединение **B6**, содержащее карбоксильную группу в *para*-положении, было на порядок лучше по ингибирующим свойствам, чем **B4**. Схожий эффект наблюдался для **B19** и **B20** – трехкратное уменьшение K_i . Обе эти пары имеют (D,D) конфигурацию дипептидного фрагмента. Однако, наблюдался и обратный эффект для (D,D) конфигурации дипептидного фрагмента: добавление гидроксила в *para*-положение AR_{ABS2} лиганда **B8** и **B12** с образованием **B9** и **B14** привело к увеличению K_i в десять раз и в два раза соответственно. Усиление

ингибирования также наблюдалось и при замещении AR_{ABS2} гидроксильной группой при (L,L) конфигурации дипептидного фрагмента: в паре **V13** и **V15** добавление гидроксила к **V13** уменьшило K_i в четыре раза. В парах **V18** и **V21**, **V3** и **V5** отсутствовало влияния этой модификации.

Усиление ингибирования GCP II, наблюдаемое при добавлении гидроксильной группы в *para*-положение AR_{ABS2} лиганда **V8** с образованием **V9**, может быть обращено: при дальнейшем замещении **V9** атомом Вг в *meta*-положении AR_{ABS2} у получившегося лиганда **V10** показано тридцатикратное снижение значения K_i (325 ± 287 нМ и $9,3 \pm 5,0$ нМ соответственно) по сравнению с **V9** и четырехкратное снижение K_i по сравнению с **V8** – предшественником **V9**. Слабое улучшение также наблюдалось у **V16** ($K_i = 8,3 \pm 5,2$ нМ) по сравнению с **V14** ($K_i = 11,0 \pm 3,9$ нМ), однако этот лиганд взаимодействовал с GCP II хуже, чем **V12** без заместителей AR_{ABS2} .

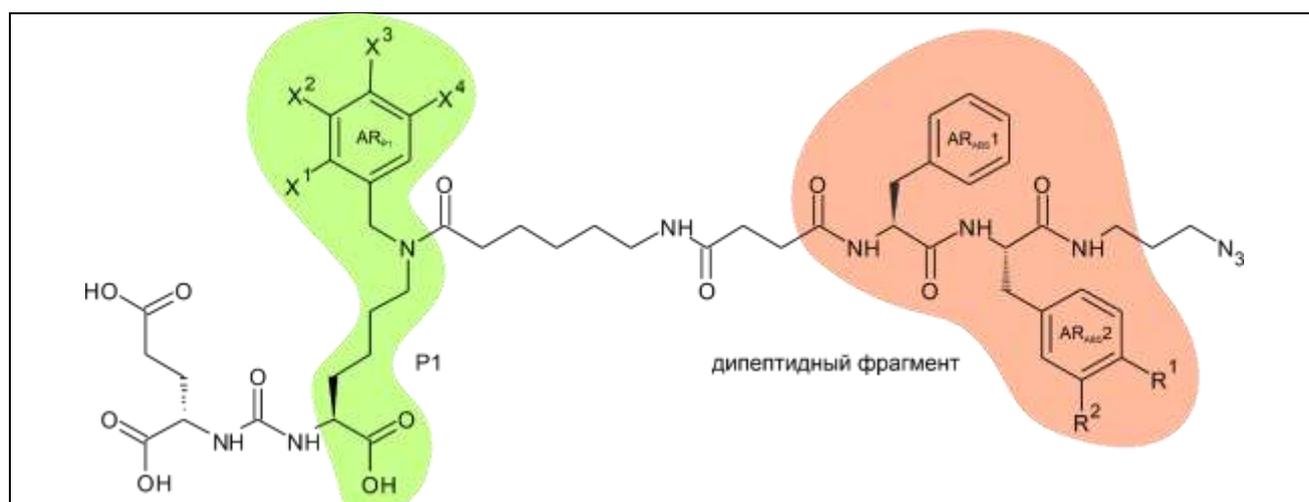
Наличие ароматического фрагмента AR_{P1} уменьшает K_i , что свидетельствует об усилении связывания лиганда с GCP II: при сравнении **V1** и **V2** видно, что модификация ϵ -аминогруппы лизина незамещенным метилбензолом позволила добиться снижения K_i более чем в 20 раз. Значения K_i , полученные для лигандов с атомом С1 в *meta*-положении X^2 (соединения **V12** и **V13**) и С1 или Вг в *para*-положении X^3 фрагмента AR_{P1} (соединения **V3**, **V4** и **V7**, **V8**) близки к значению K_i близки к значению исходного лиганда V_2 .

Вклад галогеновых заместителей AR_{P1} раскрывался при их сочетании с различными заместителями AR_{ABS2} и зависел так же от конфигурации дипептидного фрагмента линкера. Например, разница в K_i между лигандами GCP II с (L,L) и (D,D) конфигурациями мала или отсутствует для *para*-С1-замещенного AR_{P1} (**V3** и **V4**, **V5** и **V6**), однако значительна при замене С1 на Вг (**V7** и **V8**, **V9** и **V11**). Сложность оценки вклада отдельных модификаций и их совместное влияние на связывание лиганда с GCP II хорошо иллюстрируется на примере пар **V9**, **V10** и **V14**, **V16**. В паре **V9**, **V10** при наличии Вг-замещенного AR_{P1} и гидроксил-замещенного AR_{ABS2} при конфигурации дипептидного фрагмента (D,D) добавление Вг в *para*-положение AR_{ABS2} позволяет добиться снижения K_i в более чем тридцать раз. Однако при замещении той же позиции атомом Вг в **V14**, где, по сравнению с предыдущей парой, в AR_{P1} вместо Вг в *para*-положении присутствует С1 в *meta*-положении, K_i полученного лиганда **V16** меняется незначительно. При анализе сочетания заместителей в AR_{P1} показано, что добавление атома F в *meta*-положение или *ortho*-положение к С1 в *para*-положении практически не меняло K_i (**V17**-**V21** в Таблице 2).

Для того, чтобы лиганды GCP II можно было использовать в адресной доставке молекул в опухоль в рамках диагностики и терапии, необходимо минимальное количество побочных эффектов и высокая селективность к GCP II. В ходе первичной оценки неспецифического

действия на клетки с помощью теста МТТ все проверенные лиганды GCP11 без конъюгации с диагностическими или терапевтическими заместителями оказались нетоксичны в концентрациях до 50-100 мкМ для клеточных линий различной этиологии. Два лиганда с наименьшими значениями K_i (соединения **V11** и **V15**) оказались более эффективными ингибиторами, чем описанные в литературе лиганды GCP11 – 2-(фосфонометил)глутаровой кислоты и L-глутамат-мочевин-лизина, а также нетоксичными при концентрациях до 100 мкМ.

Таблица 3. Влияние заместителей AR_{P1} и AR_{ABS2} в сочетании с (L,L) конфигурацией дипептидного фрагмента линкера в поколении C лигандов GCP11.



#	X ¹	X ²	X ³	X ⁴	R ³	R ⁴	K _i , нМ
C1	NO ₂	H	H	H	H	H	1,7±0,3
C2	H	NO ₂	H	H	H	H	2,4±0,9
C3	H	H	NO ₂	H	H	H	3,6±1,2
C4	H	H	COOH	H	H	H	0,7±0,2
C5	OCH ₃	H	H	H	H	H	3,9±0,8
C6	H	H	OCH ₃	H	H	H	12±4
C7	H	H	OC ₂ H ₅	H	H	H	5±1
C8	H	OCH ₃	OCH ₃	H	H	H	9 ±3
C9	OCH ₃	H	H	OCH ₃	H	H	2,4±0,4
C10	H	H	OH	H	H	H	2,5±0,6
C11	NO ₂	H	H	H	OH	H	10 ±8
C12	H	H	COOH	H	OH	H	2,0±0,5
C13	H	H	COOH	H	OH	NO ₂	0,2±0,1

Анализ поколения C на основе лиганда GCP11 с (L,L) конфигурацией дипептидного фрагмента линкера показал возможность добиться снижения K_i при внесении нитро-, карбокси- и алкокси-заместителей в AR_{P1} и AR_{ABS2} . В лигандах GCP11 этого поколения наименьшую способность ингибировать GCP11 показали соединения с алкокси-заместителями в *para*-положении **C6** и **C7**, а также **C8** с метокси-группами в *para*- и *meta*-положении и **C11** с NO₂ в качестве *ortho*-заместителя. Самыми эффективными лигандами являются **C4** ($K_i = 0,7±0,2$ нМ) и **C13** ($K_i = 0,2±0,1$ нМ) с карбокси-группами в *para*-положении. Введение гидроксила в *para*-

положение AR_{ABS2} соединения **C4** привело к **C12** с $K_i = 2,0 \pm 0,5$ нМ, однако дополнительная модификация *мета*-положения AR_{ABS2} группой NO_2 позволила нивелировать ухудшение связывания лиганда с GСPII и получить **C13** с минимальной K_i в поколении С.

Создание новых лигандов GСPII также важно из-за разницы совместного вклада разных наборов заместителей AR_{P1} , AR_{ABS1} и AR_{ABS2} в фармакологические свойства лигандов. Так, введение в арильные фрагменты лигандов GСPII галогенов, гидроксигруппы и карбоксигруппы позволяет влиять на липофильность и неспецифическую токсичность лигандов. Модификация лиганда без значимого ухудшения константы ингибирования дает возможность улучшить фармакологические характеристики высокоаффинных лигандов GСPII.

Исследование лигандов GСPII, конъюгированных с цитотоксичными и флуоресцентными молекулами

Конъюгирование **B15** с монометил ауристатином Е (ММАЕ) приводило к снижению цитотоксичности по сравнению с исходным ММАЕ – цитостатиком, ингибирующим полимеризацию тубулина и влияющим на все делящиеся клетки. При этом снижении цитотоксичности лиганда, конъюгированного с цитостатиком, было сильнее для клеток, не экспрессирующих GСPII (рис.2). Полученное изменение цитотоксичности позволяет предположить возможность снижения неспецифического действия препарата в организме и уменьшение побочных эффектов при его приеме. В экспериментах наших коллег из НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина конъюгат **B15-ММАЕ** успешно ингибировал рост ксенографтной опухоли в мышцах на основе GСPII-экспрессирующей клеточной линии 22Rv1, слабо влияя на опухоли из клеток линии РС-3, где GСPII отсутствует.

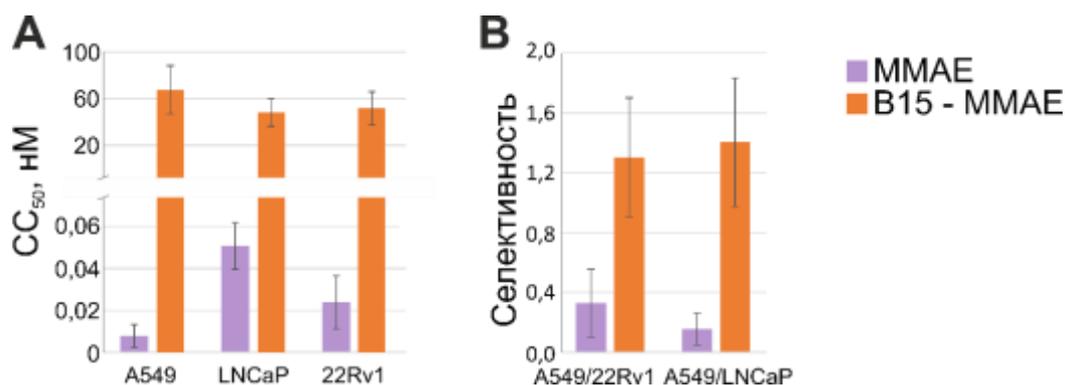


Рис.2. Сопоставление ММАЕ с конъюгатом **B15-ММАЕ** по действию на опухолевые клетки. *А.* Конъюгация с **B15** уменьшила цитотоксический эффект ММАЕ. *В.* Отношение цитотоксичностей для клеточных линий человека, экспрессирующих (22Rv1, LNCaP) и не экспрессирующих GСPII (A549). CC_{50} - концентрация соединения, необходимая для уменьшения жизнеспособности клеток на 50%. LNCaP, 22Rv1 - GСPII-экспрессирующие линии, GСPII отсутствует в A549.

Для конъюгатов **B15-Cy5** и **B15-Cy7**, содержащих флуоресцентный фрагмент, оценены константы ингибирования, цитотоксичность и эффективность окрашивания *in vitro* (с помощью проточной цитофлуориметрии и флуоресцентной микроскопии) и *in vivo* (выполнено коллегами из НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина на мышах с подсаженной опухолью из 22Rv1) (рис.3, таблица 4). Конъюгирование лигандов GСPII с флуоресцентными молекулами немного увеличивали константы ингибирования GСPII (таблица 4). Цитотоксичность (СC₅₀) конъюгата **B15-Cy7** *in vitro* составляет 12±8 мкМ, что позволяет использовать его для визуализации GСPII-содержащих опухолей в мышинной модели опухоли простаты, так как он окрашивает клетки *in vitro* в наномолярном диапазоне концентраций. Соединения **B15-Cy5** и **B15-Cy7** оказались эффективными при проведенной нашими коллегами из НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина визуализации ксенографтной опухоли в мышах, при этом токсичность для мышей была низкой.

Таблица 4. Биологическая активность соединений **B15-Cy5** и **B15-Cy7**: ингибирование GСPII и цитотоксичность. Приведены константы ингибирования исследуемых соединений и СC₅₀ для клеточных линий человека LNCaP и PC-3.

#	K _i , нМ	СC ₅₀ , мкМ	
		LNCaP	PC-3
B15	0,9±0,3	>100	>100
B15-Cy5	2,6±0,6	>100	>100
B15-Cy7	18±8	12±8	19±5
SulfoCy5	-	>100	>100
SulfoCy7	-	>100	>100

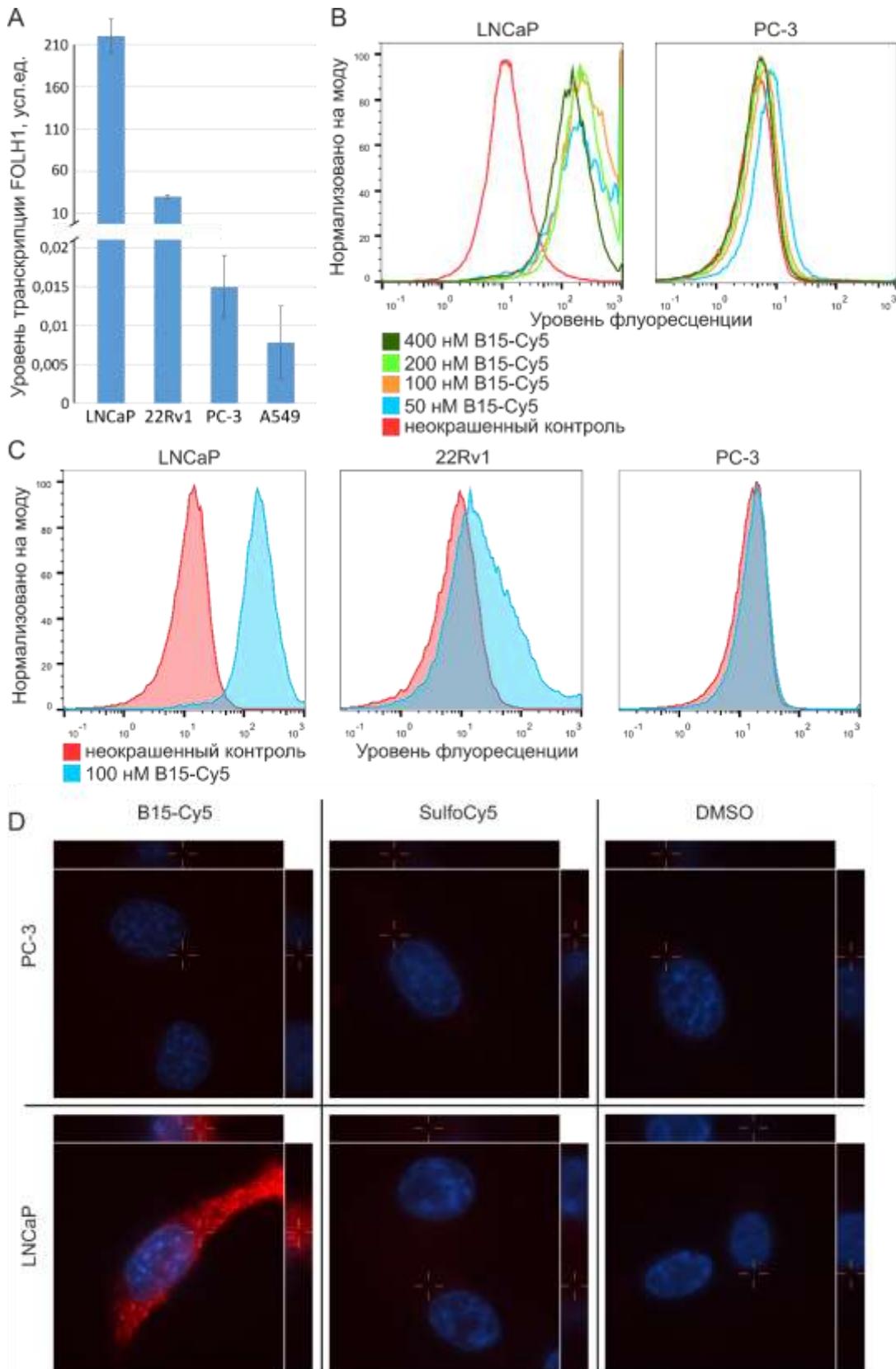


Рис. 3. Окрашивание клеток линий опухоли простаты LNCaP и PC-3 соединением B15-Cy5. А) Сравнение уровня транскрипции FOLH1 в клеточных линиях, определенный с помощью RT-qPCR. В) Распределение интенсивности окрашивания клеток LNCaP зависит от концентрации соединения B15-Cy5. С) Уровень флуоресценции при проточной цитофлуориметрии отражает экспрессию GPCII в клеточных линиях опухоли простаты. D)

Распределение флуоресцентного сигнала от **B15-Cy5** в клетках LNCaP и PC-3 на z-стеках. Окрашивание конъюгатом специфично увеличивает сигнал флуоресценции в GСPII-положительных клетках LNCaP.

Благодаря высокой специфичности **B15-Cy5** к GСPII, подтвержденной *in vitro* и *ex vivo*, это соединение было решено использовать для скрининга библиотеки последовательностей гидовых РНК для нокаута всех генов человека Gecko v2 для идентификации регуляторов экспрессии гена *FOLH1* в клетках LNCaP.

Определение потенциальных регуляторов экспрессии гена *FOLH1*

Тканеспецифичная экспрессия гена *FOLH1* достигается за счет его транскрипционной регуляции, которая мало изучена. В частности, на основе литературных данных, выделено 10 потенциальных регуляторов транскрипции *FOLH1*, большая часть которых ассоциирована с андрогеновым рецептором. Отбор потенциальных регуляторов велся среди транскрипционных факторов и протеинкиназ в подходах *in silico* и среди всех генов при скрининге полногеномной библиотеки нокаутов.

Анализ корреляций экспрессии гена *FOLH1* с транскрипционными факторами и протеинкиназами

В начале был выполнен корреляционный анализ экспрессии *FOLH1* и генов транскрипционных факторов и протеинкиназ. Корреляции экспрессии генов с *FOLH1* определены на основании данных секвенирования РНК (RNA-seq) пациентов (International Cancer Genome Consortium, ICGC) в условной норме (образцы ткани вокруг опухоли), опухоли и изменений при переходе от нормы к опухоли, а также в простате (Genotype-Tissue Expression portal, GTEx) и в клеточных линиях (Cancer Cell Line Encyclopedia, CCLE, и Catalogue of Somatic Mutations in Cancer, COSMIC). В ходе проверки части потенциальных регуляторов экспрессии *FOLH1* с порогом для модуля корреляции $> 0,5$ было решено добавить дополнительные шаги выбора вероятных регуляторов.

На следующем шаге отбора потенциальных регуляторов экспрессии *FOLH1* был проведен анализ уровня экспрессии генов транскрипционных факторов (ТФ) и протеинкиназ в клеточных линиях опухоли простаты LNCaP, VCaP, 22Rv1, PC-3, DU-145 по данным COSMIC cell lines. В этой базе данных приведена информация об уровне экспрессии гена в клеточной линии (повышенная экспрессия, пониженная экспрессия, экспрессия в норме). Те гены, чей уровень транскрипции был повышен в *FOLH1*-экспрессирующих клетках LNCaP, VCaP, 22Rv1, но находился в норме или был понижен в линиях PC-3, DU-145, в которых *FOLH1* не экспрессируется, рассматривались как активаторы транскрипции *FOLH1*. Из получившегося

списка были исключены гены, чья экспрессия различается в клетках LNCaP и VCaP, где экспрессия *FOLH1* одинакова. Т.е. транскрипция отобранных 28 генов различна между *FOLH1*-экспрессирующими линиями опухоли простаты и линиями, где *FOLH1* не экспрессируется (рис. 4).

В представленной работе было предположено, что, как в случае с андрогеновым рецептором и его партнерами, регуляция экспрессии *FOLH1* может зависеть от одновременного присутствия двух транскрипционных факторов (ТФ) или ТФ и протеинкиназы. Списки ТФ взяты с <http://humantfs.ccb.utoronto.ca/>, протеинкиназ – с <http://kinase.com/>. Были подсчитаны корреляции для пар ТФ-ТФ, ТФ-протеинкиназа и протеинкиназа-протеинкиназа. Все данные RNA-seq 375 опухолевых образцов пациентов (USA-PRAD, ICGC) были отсортированы по экспрессии *FOLH1*. Из данных RNA-seq первой и последней сотни пациентов были сформированы выборки, *FOLH1*⁺ и *FOLH1*⁻. По результатам подсчета корреляций были отобраны пары регуляторов, которые достоверно коррелировали друг с другом в *FOLH1*⁺ выборке и в *FOLH1*⁻ выборке, при этом экспрессия обоих факторов достоверно отличалась между *FOLH1*⁺ и *FOLH1*⁻ выборками. Было выбрано 59 генов, образующих такие пары. Аналогичный анализ проведен для данных RNA-seq всех клеточных линий из CCLE, отобрано 58 генов. Пересечение результатов, полученных при анализе данных RNA-seq пациентов из ICGC и клеточных линий из CCLE, позволило выделить 5 простатспецифических генов (согласно The Human Protein Atlas).

Список всех выделенных потенциальных регуляторов транскрипции *FOLH1* на основе анализа дифференциальной экспрессии в образцах клеточных линий по данным COSMIC (28 генов), CCLE (59 генов) и опухолей простаты (58 генов) с различным уровнем экспрессии *FOLH1*. Итоговый пул состоял из 84 генов, некоторые из которых встречались в нескольких списках. Часть этих регуляторов приведена на рис.4 и соответствует голубому кругу.



Рис.4. Диаграмма Венна для потенциальных регуляторов экспрессии *GCP2*. Синий круг – результаты анализа дифференциальной экспрессии в клеточных линиях, образцах опухолей простаты и литературы. Зеленый круг – результаты анализа базы данных нокаутов и нокадаунов *KnockTF*. Хаки – результат скрининга полногеномной библиотеки нокаутов. Подчеркнуты белки, отобранные с использованием разных подходов.

При проверке части потенциальных регуляторов экспрессии *FOLH1*, отобранных в ходе анализа коэкспрессии, *MAZ* оказался слабым активатором экспрессии *FOLH1*: его нокадаун в линии опухоли простаты 22Rv1 привел к уменьшению уровня экспрессии *FOLH1* в три раза. В линиях LNCaP и PC-3 значительного влияния нокадауна *MAZ* на транскрипцию *FOLH1* не выявлено. Это говорит о том, что он не является ключевым регулятором гена *FOLH1*. Нокадауны экспрессии генов *FOSL1*, *FOS*, *NKX3.1*, *FOXA1*, *NFYA*, *STEAD2*, *SPDEF*, *TFAP4*, *RBFOX2*, *CEBPB* в линиях опухоли простаты LNCaP, 22Rv1, не приводили к изменению уровня экспрессии *FOLH1*. Суперэкспрессия *FOXA1* и *GRHL2* не оказывала значимого влияния на экспрессию *FOLH1* в клеточных линиях LNCaP, 22Rv1, PC-3. Несмотря на обнаружение одного из регуляторов, что подтверждает возможность их поиска по коэкспрессии, эффективность этого подхода недостаточна, поэтому далее был проведен анализ RNA-seq данных нокаутов и нокадаунов транскрипционных факторов и скрининг библиотеки нокаутов.

Анализ транскриптомов клеточных линий с нокаутами или нокадаунами транскрипционных факторов

Для поиска вероятных регуляторов была использована база данных *KnockTF*. Она содержит RNA-seq данные для опубликованных нокадаунов и нокаутов ТФ в различных клеточных линиях. Были выбраны те ТФ, нокаут или нокадаун которых приводил к изменению экспрессии *FOLH1* в два и более раза. Эти белки ранее не упоминались в литературе как регуляторы *FOLH1*.

В качестве потенциальных регуляторов транскрипции *FOLH1* выбраны гены транскрипционных факторов GABPA, TFAP4, AR, SEBPB, NFYA, RBFOX2, SPDEF. Данные для AR сходятся с описанной в литературе слабой зависимостью транскрипции *FOLH1* от AR. Самым интересным ТФ, значительно влияющим на транскрипцию *FOLH1* в клетках LNCaP (fold change = 66) и C4-2B (fold change = 43) по данным нокдауна, является GABPA, выступающий в роли «репрессора» транскрипции *FOLH1*. Любопытно, что GABPA слабо влияет на транскрипцию *FOLH1B* – паралога *FOLH1*, в котором присутствует тот же самый внутриинтронный энхансер, что и у *FOLH1*, но отсутствует промотор исходного гена. Нокдаун SPDEF в MCF7 привел к 3,4-кратному увеличению уровня транскрипции *FOLH1* и примерно трехкратному падению *FOLH1B*. Нокдаун другого гена, TFAP4, в клетках нейробластомы приводит к четырехкратному падению экспрессии *FOLH1*. Этот же нокдаун также приводит к пятикратному падению экспрессии *FOLH1B*, что может указывать на то, что эффект опосредован энхансером *FOLH1*. Наличие влияния нокдауна другого потенциального регулятора экспрессии *FOLH1* – SEBPB – на экспрессию *FOLH1* в эмбриональных стволовых клетках человека (данные в клетках простаты отсутствуют) тоже заслуживает внимания, поскольку SEBPB в опухоли простаты позволяет клеткам пережить депривацию андрогенов при терапии.

Анализ данных скрининга полногеномной библиотеки нокаутов

Библиотека Gecko v2 (genome-scale CRISPR-Cas9 knockout) – лентивирусная полногеномная библиотека нокаутов, которая включает в себя гидовые РНК (sgRNA) против всех активно транскрибируемых генов человека. По увеличению представленности sgRNA против тех или иных генов в модифицированных клетках LNCaP, экспрессирующих Cas9 (LNCaP-Cas9), можно судить об их участии в процессе, изучаемом в рамках скрининга. Благодаря **B15-Cy5** было возможно отслеживать изменение экспрессии *FOLH1* по флуоресцентному сигналу от конъюгата, связавшегося с GСРІІ.

Следуя идее, предложенной в работе по поиску мишени моноклональных антител, мы провели двойной отбор как несветящихся после окрашивания клеток LNCaP-Cas9, потерявших GСРІІ, так и самых ярких клеток, где количество GСРІІ могло увеличиться. Схема эксперимента представлена на рис.5. Чтобы попытаться нивелировать влияние клеточного цикла и стохастических факторов, а также обогатить популяцию клеток теми нокаутами, что важны для экспрессии *FOLH1*, был выбран двойной отбор. В ходе отбора сохранялись как клетки с низким уровнем флуоресцентного сигнала, так и с высоким. В первом случае предполагали нокауты генов-«активаторов», во втором – генов-«репрессоров».

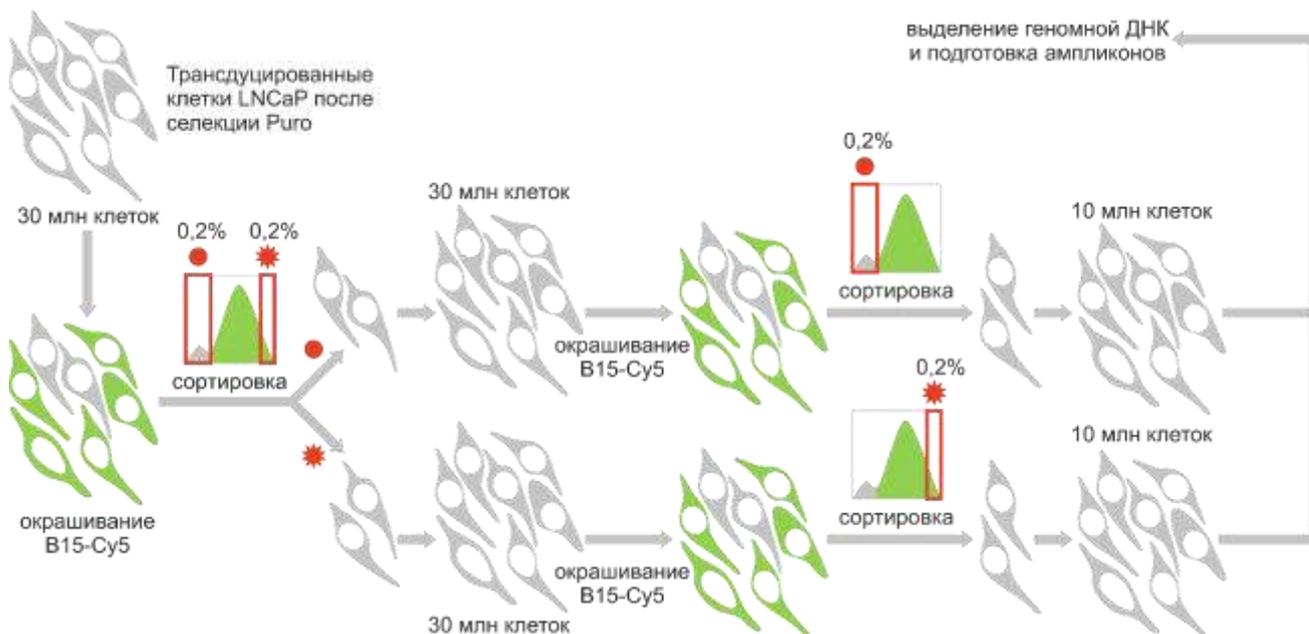


Рис.5. Схема двойного отбора клеток, составляющих 0,2% наиболее или наименее флуоресцирующих клеток LNCaP-Cas9, окрашенных B15-Cy5, при скрининге полногеномной библиотеки нокаутов Gecko v2.

Геномная ДНК из отобранных фракций клеток была использована для амплификации участков, содержащих последовательности sgRNA. Полученные таким образом ампликоны были отсеквенированы. Результаты секвенирования были обработаны с помощью Mageck Tool и на основании анализа обогащения sgRNA было выбрано порядка 40 генов, которые далее фильтровались по следующим критериям:

- 1) Известные из литературы или баз данных функции белка не противоречат предполагаемой функции белка при скрининге библиотеки нокаутов Gecko2. Если предполагаемый регулятор найден в популяции несветящихся клеток, то его функция условно определяется как «активатор», т.к. его экспрессия положительно коррелирует с экспрессией *FOLH1*. Если регулятор найден в популяции светящихся клеток, то его функция условно определяется как «репрессор», т.к. его экспрессия отрицательно коррелирует с экспрессией *FOLH1*.
- 2) Наличие достоверной корреляции с экспрессией *FOLH1*: положительной, если речь идет о популяции несветящихся клеток, и отрицательной, если нокаут гена обнаружен в популяции светящихся клеток. Допускается низкое значение коэффициента корреляции.
- 3) Наличие достоверной разницы в уровне экспрессии гена в *FOLH1*⁺ и *FOLH1*⁻ выборках образцов опухоли простаты с направлением изменения экспрессии, соответствующим изменению экспрессии *FOLH1* для «активаторов», и с обратным направлением для «репрессоров».

По этим критериям было отобрано 7 генов – *ATPAF1*, *TOPORS*, *BCL2L14*, *GPM6B*, *NKG7*, *SCUBE1*, *SERPINB5* (рис.4). Известно, что нокдаун *ATPAF1* (ATP synthase mitochondrial F1 complex assembly factor 1) серьезно ухудшает рост LNCaP в условиях депривации андрогенов. Экспрессия гена *ATPAF1* положительно коррелирует с экспрессией *FOLH1* в опухоли простаты, его экспрессия достоверно отличается в *FOLH1+* и *FOLH1-* выборках образцов опухоли простаты. *TOPORS* (TOP1 Binding Arginine/Serine Rich Protein, E3 убиквитин лигаза) убиквитинирует белок-супрессор опухоли NKX3.1, что приводит к протеасомной деградации NKX3.1. Другой регулятор, *BCL2L14* (Apoptosis facilitator Bcl-2-like protein 14), теряется в результате делеции в опухоли простаты: отсутствует в 11-40% образцов на ранних стадиях заболевания и в 35-95% образцов при прогрессирующей опухоли простаты. Экспрессия *GPM6B* (Glycoprotein M6B) уменьшается в опухоли простаты по сравнению с нормой простаты и негативно коррелирует со стадиями прогрессии опухоли. Белок GPM6B может связываться с SERT (транспортер серотонина) и приводить к значительному снижению поглощения серотонина, что замедляет рост клеток опухоли простаты DU-145 и 22Rv1. Экспрессия другого потенциального регулятора экспрессии *FOLH1* – *SCUBE1* (Signal Peptide, CUB Domain And EGF Like Domain Containing 1) в фибробластах, ассоциированных с опухолью простаты, приводит к двукратному уменьшению скорости роста опухоли и к трехкратному уменьшению ее размера. Экспрессия «репрессора» *SERPINB5* (Serpin Family B Member 5) ассоциирована с положительным прогнозом; *SERPINB5* является супрессором опухоли, теряется в опухоли простаты. Найденные гены ранее не описывались как вероятные участники регуляции транскрипции *FOLH1*.

Заключение

В ходе данной работы впервые были определены ингибирующие свойства свыше сорока синтезированных нашими коллегами лигандов GСРІІ с различными комбинациями заместителей, способных связываться с несколькими участками в структуре GСРІІ. Это позволило определить зависимость активности лигандов GСРІІ от их структуры.

Анализ взаимосвязи структура-функция лигандов GСРІІ позволил отобрать лиганды с K_i в наномолярном диапазоне и создать их эффективные конъюгаты с цитотоксическими и флуоресцентными молекулами.

Лиганд GСРІІ **V15-ММАЕ**, конъюгированный с монометил ауристатином E, был менее цитотоксичен, чем монометил ауристатин E, и при его использовании наблюдалось изменение цитотоксичности в сторону GСРІІ-экспрессирующих клеток. Конъюгация лиганда GСРІІ с флуоресцентными молекулами SulfoCy5 и SulfoCy7 привела к небольшому увеличению значений K_i . С помощью проточной цитофлуориметрии и флуоресцентной микроскопии

показано эффективное окрашивание GСPII-экспрессирующих клеток лигандом, конъюгированным с SulfoCy5. Возможность окрашивания конъюгатами с SulfoCy5 и SulfoCy7 также показана нашими коллегами на мышах с ксенографтной опухолью из GСPII-экспрессирующих клеток 22Rv1. Специфичность **B15-Cy5** к GСPII позволила использовать его для поиска потенциальных регуляторов экспрессии гена *FOLH1* в комбинации с библиотекой последовательностей гидовых РНК для системы CRISPR-Cas9.

На основании анализа транскрипционных данных, в том числе транскриптомов образцов с нокаутами и нокдаунами транскрипционных факторов, и скрининга полногеномной библиотеки нокаутов Gecko v2 сформирован пул генов, кодирующих потенциальные белки-регуляторы экспрессии *FOLH1* (рис.4). Количество регуляторов, идентифицированных с использованием разных подходов, превышает ожидаемое число пересечений при случайном выборе белков. Так, найденные в ходе скрининга библиотеки нокаутов регуляторы АТРАF1, TOPORS, NKG7, SCUBE1, GPM6B также соответствовали критериям, использованным при анализе корреляций экспрессии. Также, нокдауны транскрипционных факторов AR и SPDEF приводили к изменению экспрессии *FOLH1* согласно транскриптомным данным, и при этом результатах анализа корреляции экспрессии генов, так и данных образцов с нокдаунами. Только часть пула регуляторов связана с известными регуляторными каскадами в опухоли простаты: FOXA1, GATA2, GRHL2, CREB3L4, HOXB13, NKX3.1, GABPA являются партнерами андрогенового рецептора AR и могут действовать в рамках каскада андрогенового рецептора. Среди проверенных регуляторов транскрипционный фактор MAZ являлся слабым активатором транскрипции *FOLH1* по данным нокдауна. Нокдауны *FOSL1*, *FOS*, *NKX3.1*, *FOXA1*, *NFYA*, *STEAP2*, *SPDEF*, *TFAP4*, *RBFOX2*, *CEBPG* в линиях опухоли простаты LNCaP, 22Rv1, PC-3 не приводили к изменению уровня экспрессии *FOLH1*. Суперэкспрессия FOXA1 и GRHL2 не оказывала значимого влияния на экспрессию *FOLH1* в клеточных линиях LNCaP, 22Rv1, PC-3.

Анализ регуляторов экспрессии *FOLH1* и установление их принадлежности к регуляторным каскадам в простате и опухоли простаты позволят использовать их в качестве мишеней для диагностики и терапии заболеваний в будущем.

ВЫВОДЫ

1. В результате проведенного структурно-функционального анализа низкомолекулярных лигандов глутаматкарбоксипептидазы II (GSPII) выявлены соединения с K_i в наномолярном диапазоне. Показано, что при варьировании части их структурных элементов сохранялись ингибирующие свойства, что упрощает дальнейшую оптимизацию фармакологических характеристик.
2. По сравнению с монометил ауристатином E, цитотоксичность его конъюгата с лигандом GSPII **V15** уменьшалась для клеток, не экспрессирующих GSPII, при общем снижении цитотоксичности *in vitro*.
3. Лиганд **V15**, конъюгированный с флуорофором SulfoCy5, окрашивал в наномолярных концентрациях GSPII-экспрессирующие клетки опухоли простаты, а также имел низкую цитотоксичность.
4. Предложен метод поиска регуляторов экспрессии гена *FOLH1* с помощью сортировки по интенсивности окрашивания лигандом **V15-Cy5** пула клеток с GSPII, трансдуцированных вирусами с гидовыми РНК для нокауты всех функциональных генов.
5. Идентифицировано *in silico* несколько десятков вероятных регуляторов экспрессии *FOLH1*, один из которых, транскрипционный фактор MAZ, валидирован как активатор транскрипции *FOLH1* в клетках опухоли простаты 22Rv1.

ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ В РЕЦЕНЗИРУЕМЫХ ИЗДАНИЯХ

- [1] Synthesis and biological evaluation of psma ligands with aromatic residues and fluorescent conjugates based on them / A. E. Machulkin*, **R. R. Shafikov***, A. A. Uspenskaya et al. // *Journal of Medicinal Chemistry*. — 2021. — Vol. 64, no. 8. — P. 4532–4552. Impact Factor = 7.446 (Web of Science)
*равный вклад авторов.
- [2] Influence of dipeptide linker configuration on the activity of psma ligands / A. Uspenskaya, A. E. Machulkin, E. A. Nimenko, **R.R. Shafikov** et al. // *Mendeleev Communications*. — 2020. — Vol. 30. — P. 756–759. Impact Factor = 1.77(Web of Science)
- [3] Synthesis and initial in vitro evaluation of psma-targeting ligands with a modified aromatic moiety at the lysine e-nitrogen atom / N. Y. Zyk, A. P. Ber, E. A. Nimenko, **R.R. Shafikov** et al. // *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. — 2022. — P. 128840. Impact Factor = 2.823 (Web of Science)
- [4] Synthesis, characterization and preclinical evaluation of small-molecule prostate-specific membrane antigen targeted monomethyl auristatin e conjugate / A. E. Machulkin, A. A. Uspenskaya, N. U. Zyk, E.A. Nimenko, A.P. Ber, S.A. Petrov, V.I. Polshakov, **R.R. Shafikov** et al. // *Journal of Medicinal Chemistry*. — 2021. — Vol. 64, no. 23. — P. 17123–17145. Impact Factor =7.446 (Web of Science)

ДРУГИЕ ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

- [1] Synthesis and biological evaluation of psma targeted fluorescent conjugates / A. Machulkin, **R. Shafikov**, A. Uspenskaya et al. // 26th EFMC International Symposium on Medicinal Chemistry (EFMC-ISMС-2021). — 2021. — P. V002.
- [2] Синтез и оптимизация структуры линкеров лигандов ПСМА и получение диагностических и терапевтических конъюгатов / А. А. Успенская, Е. А. Нищенко, **Р. Р. Шафиков** и др. // *МАРКОВНИКОВСКИЕ ЧТЕНИЯ: ОРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ ОТ МАРКОВНИКОВА ДО НАШИХ ДНЕЙ*. — 2022. — С. 92–93.
- [3] Конъюгат монометил ауристатина Е на основе лиганда ПСМА: синтез и доклиническое исследование / А. Э. Мачулкин, А. А. Успенская, **Р. Р. Шафиков** и др. // *Всероссийский конгресс по химии гетероциклических соединений (KOST2021)* Сборник тезисов. — 2021. — С. 235–235.
- [4] Синтез и биологические испытания конъюгатов ПСМА с диагностическими и терапевтическими агентами / А.А. Успенская, А.Э. Мачулкин, С.А. Петров, А.П. Бер, Е.А. Нищенко, Н.Ю. Зык, Д.А. Скворцов, **Р.Р Шафиков** и др. // *МАРКОВНИКОВСКИЕ ЧТЕНИЯ: ОРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ ОТ МАРКОВНИКОВА ДО НАШИХ ДНЕЙ (WSOC-2020)*. — 2020. — С. 91–91.