

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Шнайдер Полина Владимировна

**Исследование вклада межклеточной коммуникации в возникновение
резистентности злокачественных опухолей яичника к противоопухолевым
препаратам**

1.5.4. Биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

**Москва
2024**

Работа выполнена в лаборатории молекулярной онкологии ФГБУ Федерального научно-клинического центра физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина Федерального Медико-Биологического Агентства России (ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России).

**Научный
руководитель**

Шендер Виктория Олеговна
кандидат химических наук

**Официальные
оппоненты**

Лазаревич Наталия Леонидовна
доктор биологических наук, профессор, заведующий
отделом иммунохимии ФГБУ «Национальный
медицинский исследовательский центр онкологии имени
Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения
Российской Федерации (НИИ Канцерогенеза)

Морозов Алексей Владимирович
доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник
лаборатории регуляции внутриклеточного протеолиза
ФГБУН «Институт молекулярной биологии им. В.А.
Энгельгардта» Российской академии наук (ИМБ РАН)

Ульянов Сергей Владимирович
доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник
лаборатории структурно-функциональной организации
хромосом ФГБУН «Институт биологии гена» Российской
академии наук (ИБГ РАН)

Защита диссертации состоится 27 декабря 2024 г. в 16 ч 00 мин на заседании диссертационного совета МГУ.015.1 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: Москва, Ленинские горы, д.1, стр. 12, биологический факультет, ауд. М1.

E-mail: dkiselevs@mail.com

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на портале:

<https://dissovet.msu.ru/dissertation/3262>

Автореферат разослан «___» _____ 2024 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Д.Б. Киселевский

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность и степень разработанности темы исследования

Согласно статистике, примерно у 38% людей на протяжении всей жизни будет диагностировано злокачественное новообразование. Несмотря на то, что процент смертности, вызванной этим заболеванием, сокращается, онкологические заболевания по-прежнему являются второй по распространенности причиной смерти после заболеваний сердечно-сосудистой системы. В настоящее время существует большое количество противоопухолевых препаратов, но даже самые инновационные из них не могут обеспечить пациентам полного выздоровления и отсутствия рецидива.

Существующие работы, посвященные изучению коммуникации опухолевых клеток и клеток микроокружения подчеркивают весомый вклад межклеточной коммуникации в формирование устойчивости к лечению, но преимущественно описывают случаи, когда опухоль не подвергается стрессовому воздействию (например, химиотерапии). Однако немногочисленные исследования на некоторых типах рака показали, что секретируемые погибающими опухолевыми клетками молекулы могут оказывать существенное влияние на устойчивость реципиентных опухолевых клеток к терапии, но в большинстве случаев механизмы действия этих молекул остаются неясными. Основным недостатком этих исследований является их сосредоточение на клеточных моделях *in vitro*, которые не отражают сложных взаимодействий, происходящих в живых организмах. Решением данной проблемы может быть использование образцов различных биологических жидкостей, контактирующих с опухолью. Так, например, ценной моделью для изучения межклеточной коммуникации являются асцитные жидкости пациентов с аденокарциномой яичника, омывающие опухоль и близлежащие органы.

Изучение механизмов коммуникации опухолевых клеток, особенно в условиях терапевтического стресса, представляет собой важное направление современных онкологических исследований. Эти процессы играют ключевую роль в формировании устойчивости опухолей к лечению и могут стать основой для разработки более эффективных терапевтических подходов. Использование биологических образцов, таких как асцитные жидкости, позволяет исследовать опухолевую коммуникацию в естественных условиях, что значительно повышает ценность получаемых данных.

Целью настоящей работы являлось изучение вклада межклеточной коммуникации в формирование устойчивости к ДНК-повреждающим агентам в клетках аденокарциномы яичника.

Для выполнения данной цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Выяснить, как секретомы погибающих под действием цисплатина опухолевых клеток изменяют фенотип и молекулярные каскады в опухолевых клетках в условиях *in vivo* и *ex vivo*.
2. Изучить влияние секретомов от погибающих клеток на опухолевые клетки и клетки нормального эпителия *in vitro*.
3. Исследовать компоненты, секретируемые погибающими опухолевыми клетками и определить способ секреции сигнальных молекул в условиях *in vitro*.
4. Определить молекулярные каскады, способствующие формированию устойчивости опухолевых клеток к ДНК-повреждающим агентам.

Научная новизна работы

В ходе данной работы впервые проанализирована способность асцитных жидкостей пациентов с аденокарциномой яичника после химиотерапии (ХТ) формировать устойчивость в опухолевых клетках к цисплатину и запускать перестройку внутриклеточных молекулярных каскадов.

Нами был разработан протокол генерации секретомов опухолевых клеток, имитирующий схему химиотерапевтического лечения и позволяющий использовать полученные секретомы для культивирования реципиентных клеток и изучения состава секретомов различными методами.

Используя разработанный протокол, мы оценили протективный эффект и белковый состав секретомов погибающих и контрольных опухолевых клеток, а также клеток неонкотрансформированных тканей. Мы показали, что только секретомы от погибающих опухолевых клеток способны приводить к формированию устойчивости к терапии реципиентных опухолевых клеток. Это сопровождалось значительными отличиями в профилях белков, секретируемых погибающими опухолевыми клетками, и значительным изменением экспрессии генов в реципиентных опухолевых клетках под действием таких секретомов. Также мы обнаружили, что секретомы от погибающих опухолевых клеток не приводят к формированию устойчивости у клеток

нормальных тканей.

Мы продемонстрировали ранее не описанный механизм приобретения устойчивости к ДНК-повреждающим агентам за счет предварительной активации систем репарации ДНК в реципиентных опухолевых клетках.

Теоретическая и практическая значимость работы

Исследование расширяет существующие знания об особенностях межклеточной коммуникации опухолевых и нормальных клеток в ответ на ХТ и ее влиянии на формирование устойчивости к лечению. Впервые проведен системный анализ влияния секретомов погибающих клеток на химиорезистентность и определены основные события, приводящие к повышению эффективности репарации ДНК в реципиентных клетках. Эти данные способствуют развитию фундаментальных представлений о динамике взаимодействий между опухолевыми клетками под действием ХТ и открывают новые перспективы для изучения механизмов приобретенной резистентности к противоопухолевым препаратам. Полученные результаты имеют прикладное значение для разработки более эффективных стратегий противоопухолевой терапии, направленных на блокирование межклеточной коммуникации.

Объект, методология и методы исследования

В работе использован комплексный подход, включающий эксперименты *ex vivo* и *in vitro*. Была разработана модель для изучения межклеточной коммуникации *in vitro*. Для изучения влияния ХТ на формирование химиорезистентности использовались 3 клеточные линии рака яичника, 3 клеточные линии неопухолевого происхождения и первичные культуры, выделенные из асцитных жидкостей от 13 пациентов. Методы исследования включали получение внеклеточных везикул, клеточные тесты на цитотоксичность, анализ ДНК-комет, анализ клеточного цикла, выделение и секвенирование РНК, масс-спектрометрический анализ белков, вестерн-блот, анализ треков наночастиц и флуоресцентную микроскопию.

Степень достоверности полученных результатов

Все эксперименты проводились в двух и более повторностях. Результаты представлены в виде среднего значения с указанием среднеквадратического отклонения. Статистические различия между двумя группами оценивались с помощью непарного двухстороннего t-теста. Используемые экспериментальные модели и методики соответствуют общепризнанным международным стандартам.

Основные положения, выносимые на защиту

- 1) Химиотерапия изменяет профили секреции опухолевых клеток и вызывает более интенсивную секрецию внеклеточных везикул.
- 2) Погибающие под действием химиотерапии опухолевые клетки секретируют набор молекул, способствующий формированию химиорезистентности в оставшейся опухоли.
- 3) Явление приобретенной химиорезистентности, опосредованной секреторами, характерно только для опухолевых клеток и не наблюдается в нормальных клетках.
- 4) Секреторы от погибающих клеток повышают эффективность репарации ДНК, подготавливая опухолевые клетки к последующему терапевтическому воздействию.

Личный вклад автора

Основные результаты были получены лично автором, либо при его непосредственном участии. Автор осуществлял планирование и проведение экспериментов, анализ полученных результатов, подготовку публикаций и диссертации.

Апробация результатов

Результаты работы представлены на 13 российских и международных конференциях: V Международная Конференция “Постгеном 2018” (Казань, 2018), EuPA 2019 (Потсдам, Германия, 2019), IX Российский Симпозиум «Белки и Пептиды» (Сочи, 2019), 44th FEBS Congress (Краков, Польша, 2019), 45th FEBS Virtual Congress (Любляна, Словения, 2021), HUPO ReConnect (2021), X Российский Симпозиум «Белки

и Пептиды» (Сочи, 2021), Итоговая Научно-Практическая Конференция ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России (Москва, 2021), Experimental Biology (Филадельфия, США, 2022), NURO 2023 (Пусан, Южная Корея, 2023), Итоговая Научно-Практическая Конференция ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА им. Лопухина России (Москва, 2023), Биохимия человека 2024 (Москва, 2024), VI Международная Конференция “Постгеном 2024” (Москва, 2024).

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 115 страницах и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и обсуждения, заключения, выводов и списка литературы, который включает 290 источников. Диссертация содержит 44 рисунка и 5 таблиц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Химиотерапия приводит к формированию более устойчивого фенотипа клеток рака яичника *ex vivo*

В данном исследовании была собрана коллекция парных асцитных жидкостей до и после химиотерапии (ХТ) от 16 пациентов с диагностированным раком яичника. Из асцитных жидкостей до ХТ были выделены клеточные осадки, из которых были получены первичные культуры опухолевых клеток. Инкубация первичных культур хемонаивных опухолевых клеток с асцитными жидкостями от тех же пациентов после ХТ привела к формированию их устойчивости к цисплатину, при этом асцитные жидкости до ХТ не вызывали такого эффекта (Рисунок 1). Эти результаты свидетельствуют о вкладе межклеточной коммуникации, изменяющейся во время лечения, в формирование устойчивости к ХТ.

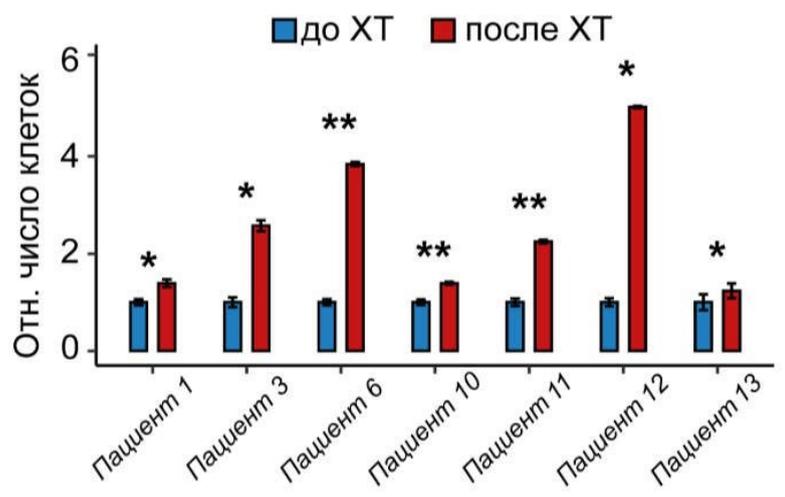


Рисунок 1. Результаты цитотоксического теста (MTT-теста) первичных культур опухолевых клеток из асцитных жидкостей до ХТ после инкубации с аутологичными асцитными жидкостями (до и после ХТ) в течение 72 часов и последующей инкубации с 10 μ M цисплатина в течение 48 часов. Статистическая значимость была определена при помощи критерия Стьюдента, где “*” — p -value < 0,05; “**” — p -value < 0,005. Каждое измерение проведено в трех биологических повторах.

Транскриптомный анализ реципиентных клеток выявил 365 дифференциально экспрессирующихся генов, из которых 134 гена повысили свою экспрессию после инкубации с асцитами после ХТ по сравнению с асцитами до ХТ. Эти гены были связаны с регуляцией клеточного цикла, репарации ДНК, сплайсинга мРНК и трансляции (Рисунок 2). Таким образом, асцитные жидкости после ХТ вызывают

значительные изменения в клетках, подготавливая их к стрессовому воздействию и способствуя химиорезистентности.

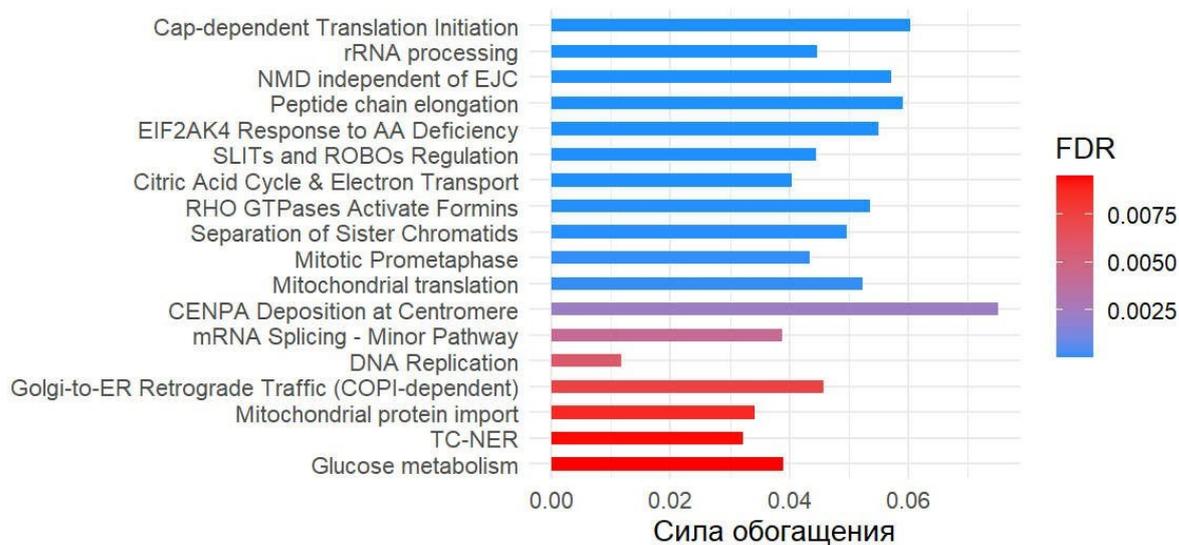


Рисунок 2. Анализ обогащения набора генов (Gene set enrichment analysis, GSEA) для первичных культур опухолевых клеток, инкубированных с асцитными жидкостями до и после ХТ. На диаграмме представлены пути, характеризующие гены с повышенной экспрессией в опухолевых клетках, инкубированных с асцитами после лечения относительно асцитных жидкостей до ХТ. Формула для ранжирования списка генов: $\text{Log}_2\text{FoldChange} * \log_{10}(p\text{-value})$. Результаты обогащения были получены с использованием базы данных Reactome.

2. Исследование условий приобретения химиорезистентности в системе *in vitro*

Асцитная жидкость содержит молекулы, секретируемые как опухолевыми клетками, так и клетками микроокружения. На биологические эффекты асцитных жидкостей могут влиять такие параметры, как объем жидкости, время ее накопления и количество пройденных курсов ХТ, которые варьируются среди пациентов. Чтобы определить вклад секреции именно погибающих опухолевых клеток, необходимо исключить влияние клеток микроокружения и стандартизировать параметры генерации секретомов. Для этого мы разработали протокол получения секретомов от погибающих клеток (АпоС) в условиях *in vitro* (Рисунок 3). В качестве модельного объекта использовались клетки аденокарциномы яичника SKOV3, которые подвергались обработке цисплатином в течение 7 часов. После этого среду с цисплатином удаляли, клетки промывали и инкубировали в бессывороточной среде еще 41 час. Секретомы представляли собой фракцию внеклеточных везикул, полученную с помощью ультрафильтрационного картриджа с отсечкой по

молекулярной массе белка в 100 кДа. Концентрацию цисплатина подбирали таким образом, чтобы половина клеток погибала к моменту сбора секретомов (Рисунок 4).

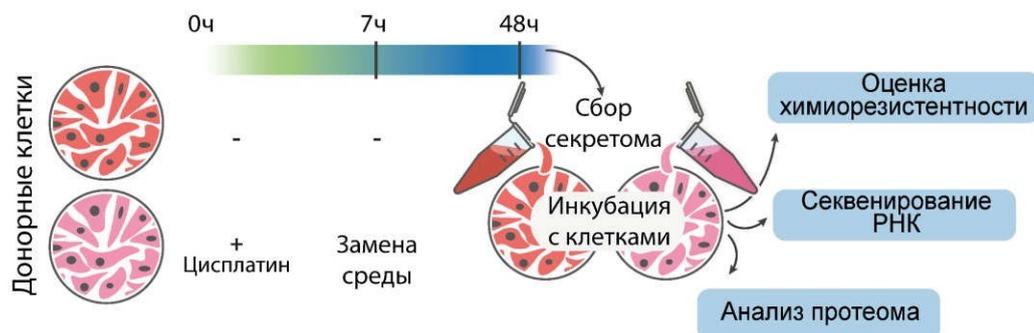


Рисунок 3. Схема генерации секретомов от клеток, погибающих под действием цисплатина, и контрольных клеток SKOV3.

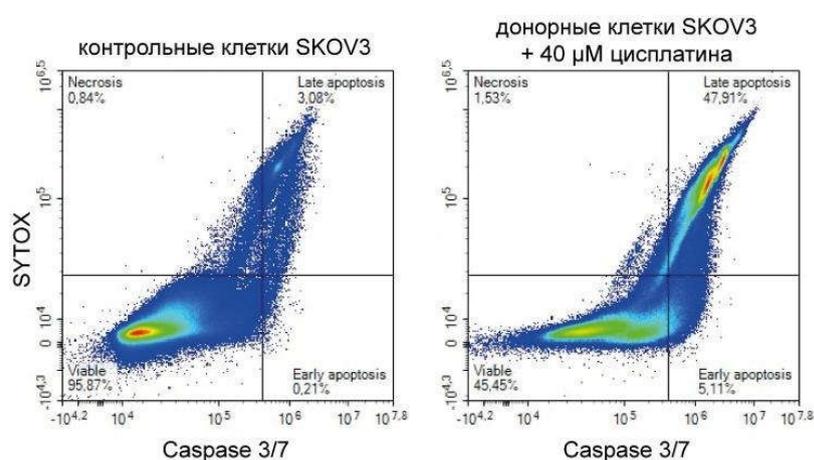
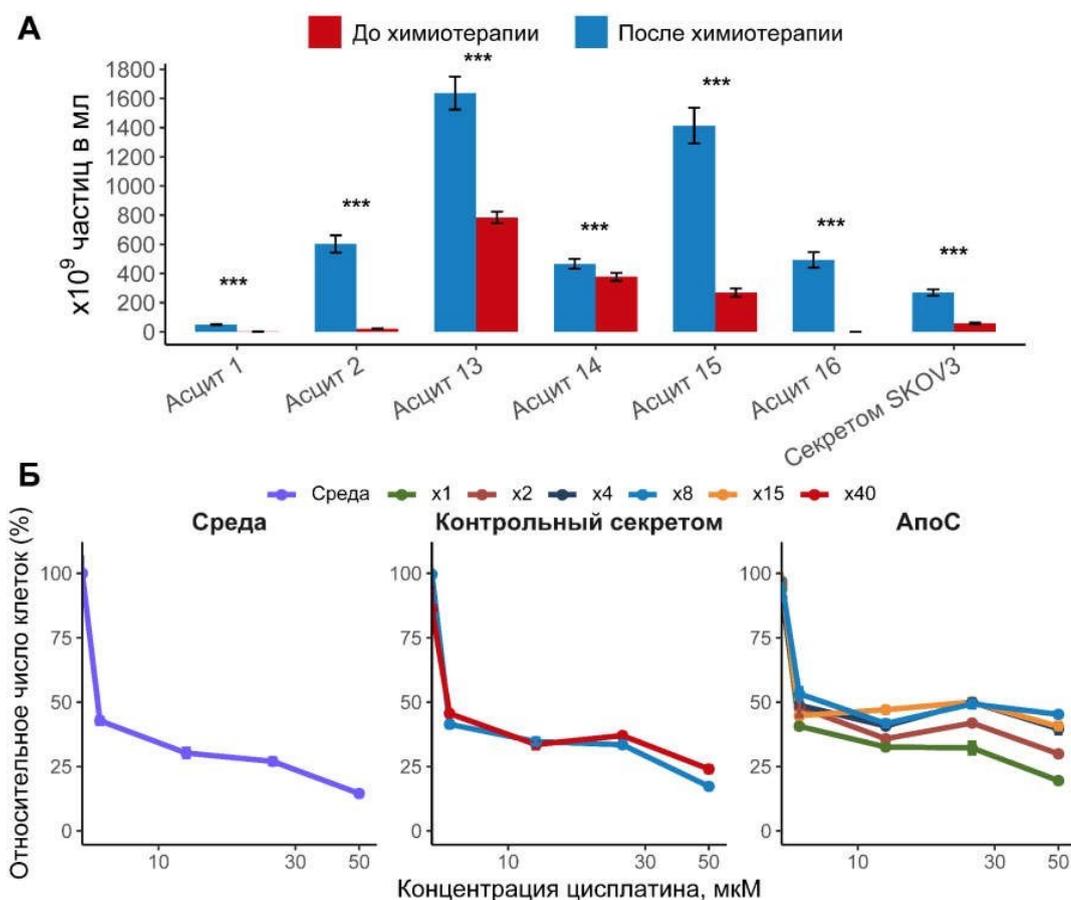


Рисунок 4. Результат теста на апоптоз (CellEvent Caspase-3/7 Green) донорных клеток SKOV3. Клетки проинкубировали с 40 μ M цисплатина на протяжении 7 часов, после чего клетки промывали 3 раза PBS и заменяли среду на бессывороточную, не содержащую цисплатин, далее клетки инкубировали еще 41 час и проводили тест на апоптоз.

Далее мы оценили количество внеклеточных везикул в асцитных жидкостях пациентов до и после ХТ, а также в кондиционных средах от погибающих и контрольных клеток SKOV3, используя анализ треков наночастиц. Было обнаружено, что ХТ приводила к значительному увеличению концентрации внеклеточных везикул как в асцитных жидкостях, так и в кондиционных средах (Рисунок 5А). Однако секретомы, полученные в условиях *in vitro*, имели более низкое содержание внеклеточных везикул по сравнению с асцитными жидкостями, вероятно, из-за более короткого времени генерации и меньшего количества донорных клеток.

Интересно, что эффективность асцитных жидкостей в формировании

химиорезистентности не всегда зависела от концентрации везикул. Например, пациенты 1 и 13 обладали минимальной и максимальной концентрацией везикул в



асцитных жидкостях после ХТ из имеющейся выборки, соответственно (Рисунок 5А). Однако степень протективного эффекта данных секретомов была схожа (Рисунок 1).

Рисунок 5. (А) Анализ треков наночастиц внеклеточных везикул, полученных из парных асцитных жидкостей (до и после химиотерапии) или секретомов клеточной линии SKOV3. Статистическая значимость была определена при помощи критерия Стьюдента, где “***” — p -value $< 0,00005$. (Б) Результаты теста на цитотоксичность (MTT-тест) реципиентных клеток, инкубированных с культуральной средой или секретомами от погибающих (АпоС) или контрольных клеток SKOV3 разной степени концентрирования на протяжении 72 часов и цисплатином на протяжении последующих 48 часов. Каждое измерение проведено в трех биологических повторах.

В ходе ХТ в условиях *in vivo* большинство опухолевых клеток погибает, то есть донорных клеток, погибающих апоптозом, значительно больше, чем реципиентных выживших клеток. Таким образом, при генерации секретомов *in vitro* необходимо концентрирование кондиционной среды от погибающих клеток. Мы определили, что оптимальным является концентрирование секретомов в 8 раз (Рисунок 5Б).

Также мы показали, что концентрирование контрольных секретомов до уровня секретомов от погибающих клеток не приводило к формированию устойчивости в реципиентных клетках (Рисунок 6). Это говорит о том, что важным фактором является не только количество везикул, но и их содержимое.

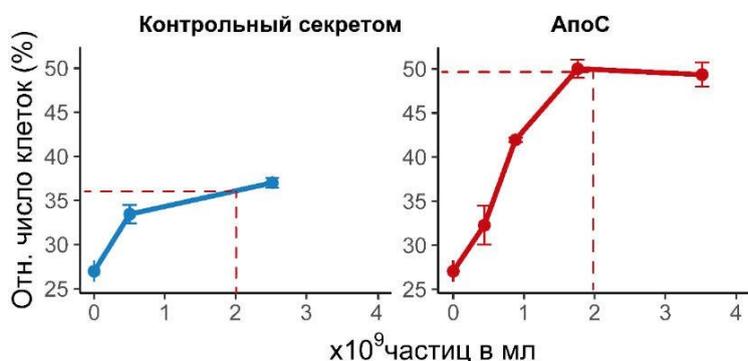


Рисунок 6. Зависимость выживаемости реципиентных опухолевых клеток под действием 25 μ M цисплатина от концентрации внеклеточных везикул в секретоме, с которыми они были инкубированы. Каждое измерение проведено в трех биологических повторах.

3. Анализ транскриптомных и протеомных изменений в реципиентных опухолевых клетках SKOV3 после инкубации с ApoC

Для оценки эффектов ApoC на реципиентные опухолевые клетки SKOV3 был проведен их транскриптомный и протеомный анализы.

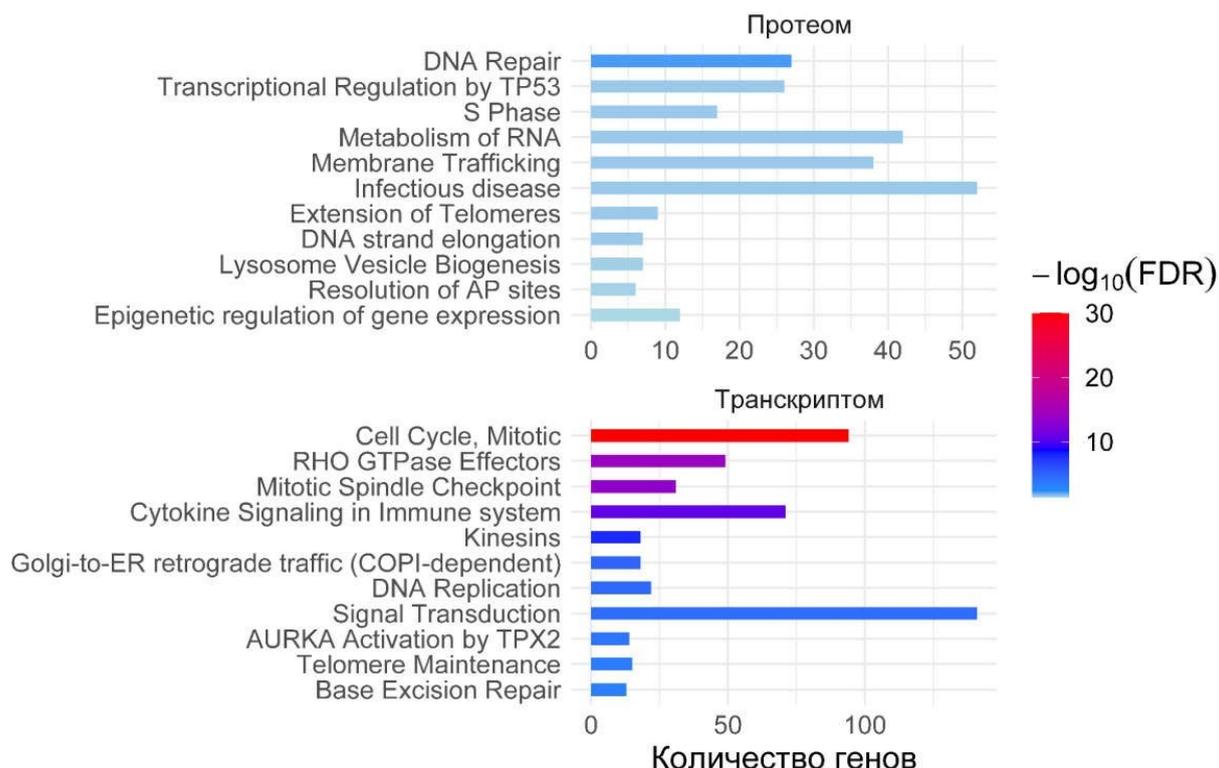


Рисунок 7. Функциональная аннотация генов, повышающих свою экспрессию на уровне транскриптов (снизу) и белков (сверху) в клетках, инкубированных с секретоматами от погибающих клеток относительно контрольных секретомов ($\text{Log}_2\text{FoldChange} \geq 1$). Результаты обогащения были получены с использованием базы данных Reactome.

Всего было выявлено 1117 дифференциально экспрессирующихся генов, из которых 726 показали повышение экспрессии в клетках, инкубированных с АпоС по сравнению с контрольными секретами. Функциональный анализ выявил активацию процессов регуляции клеточного цикла, репарации ДНК, внутриклеточного транспорта и иммунного ответа (Рисунок 7).

Протеомный анализ выявил 712 белков, повысивших свою представленность более чем в два раза в клетках, инкубированных с АпоС. Белки, повысившие свою представленность под действием АпоС, были вовлечены в пути репарации ДНК, регуляции клеточного цикла и метаболизма РНК (Рисунок 7).

Важно отметить, что эти изменения происходят в реципиентных клетках, не контактировавших с цисплатином. Таким образом, как на транскрипционном, так и на протеомном уровне наблюдались общие тенденции, связанные с активацией молекулярных каскадов репарации ДНК и регуляции клеточного цикла.

4. АпоС способствуют формированию химиорезистентности у опухолевых, но не нормальных клеток

Эффекты секретомов погибающих под действием цисплатина клеток, наблюдаемые на клеточной линии SKOV3, хорошо соотносятся с эффектами, наблюдаемыми в ходе экспериментов *ex vivo* с асцитными жидкостями и первичными культурами опухолевых клеток. Однако обнаруженный нами протективный эффект асцитных жидкостей может быть обусловлен и вкладом клеток из опухолевого микроокружения.

Для оценки паттернов секреции нормальных клеток нами были выбраны три клеточные линии: hTERT FT282 (эпителий фаллопиевой трубы), HaCaT (кератиноциты, эпителиальный фенотип) и дермальные фибробласты (мезенхимальный фенотип). Также мы расширили панель опухолевых клеток, добавив клеточные линии, принадлежащие разным подтипам рака яичника – OVCAR3 (серозный рак яичника) и MESOV (цистаденокарцинома).

Прежде всего были проведены эксперименты, в которых и донорными, и реципиентными были клетки одной и той же клеточной линии. Оказалось, что только опухолевые клетки способны формировать химиорезистентность за счет индуцированных терапией секретомов (Рисунок 8А).

Далее, мы провели эксперимент, где в роли доноров выступали клетки SKOV3,

ав качестве реципиентов — нормальные клетки. Оказалось, что секреты от SKOV3 не приводят к возникновению устойчивости к цисплатину у нормальных клеток. Более того, АпоС от опухолевых клеток оказался токсичным для клеточной линии HaCaT и дермальных фибробластов (Рисунок 8Б). Также был проведен обратный эксперимент, когда в качестве доноров выступали нормальные клетки, а в роли реципиентных — клетки SKOV3. Оказалось, что секреты нормальных клеток обладают слабым протективным эффектом или не обладают вовсе (Рисунок 8В).

Таким образом, нами продемонстрировано, что только опухолевые клетки приобретают химиорезистентность в результате межклеточной коммуникации, опосредованной терапией. Однако стоит учитывать, что помимо отличий в профилях секреции опухолевых и нормальных клеток, опухолевые клетки обладают повышенной проницаемостью мембраны, что может способствовать более эффективному поглощению компонентов из внеклеточного пространства.

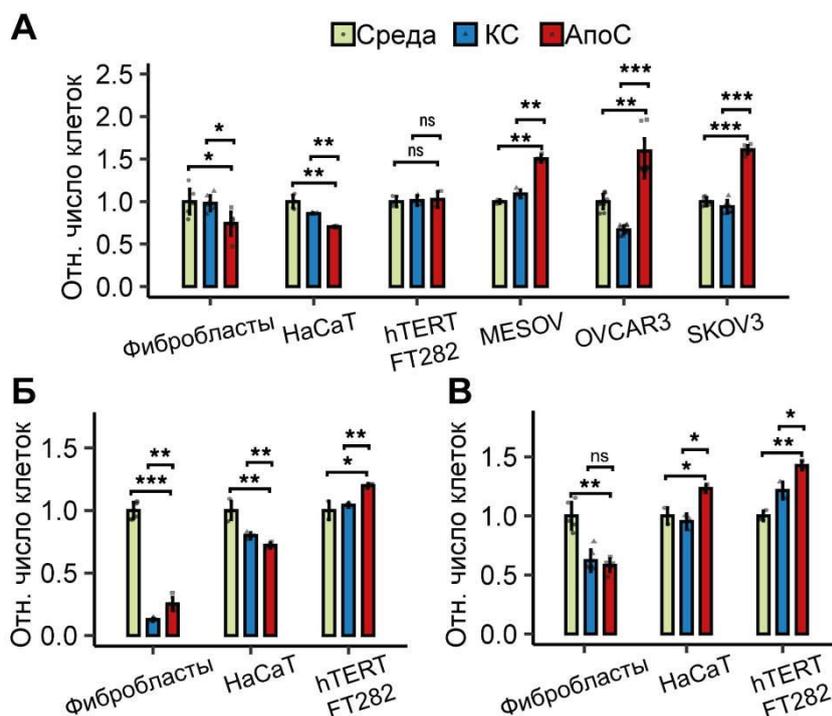


Рисунок 8. Результаты цитотоксического теста (MTT-теста) реципиентных клеток после инкубации с секретами (КС и АпоС) или средой, а также цисплатином по схеме, представленной на рисунке 3. (А) Донорными и реципиентными были клетки одной и той же клеточной линии. (Б) Доноры – SKOV3, реципиенты – неопухолевые клетки. (В) Доноры – неопухолевые клетки, реципиенты – SKOV3. Статистическая значимость была определена при помощи критерия Стьюдента, где “*” — p -value $< 0,05$; “**” — p -value $< 0,005$, “***” — p -value $< 0,00005$. Каждое измерение проведено в трех биологических повторах.

5. Сравнение паттернов секреции нормальных и опухолевых клеток в ответ ХТ

Мы обратили внимание, что эффекты секретомов погибающих опухолевых клеток сильно отличаются от эффектов секретомов опухолевых клеток при обычных условиях и секретомов нормальных клеток в целом. Для оценки паттернов секреции нормальными и опухолевыми клетками под действием цисплатина мы провели сбор секретомов от контрольных и погибающих под действием цисплатина клеток SKOV3, OVCAR3, MESOV, HaCaT, hTERT FT282 и дермальных фибробластов.

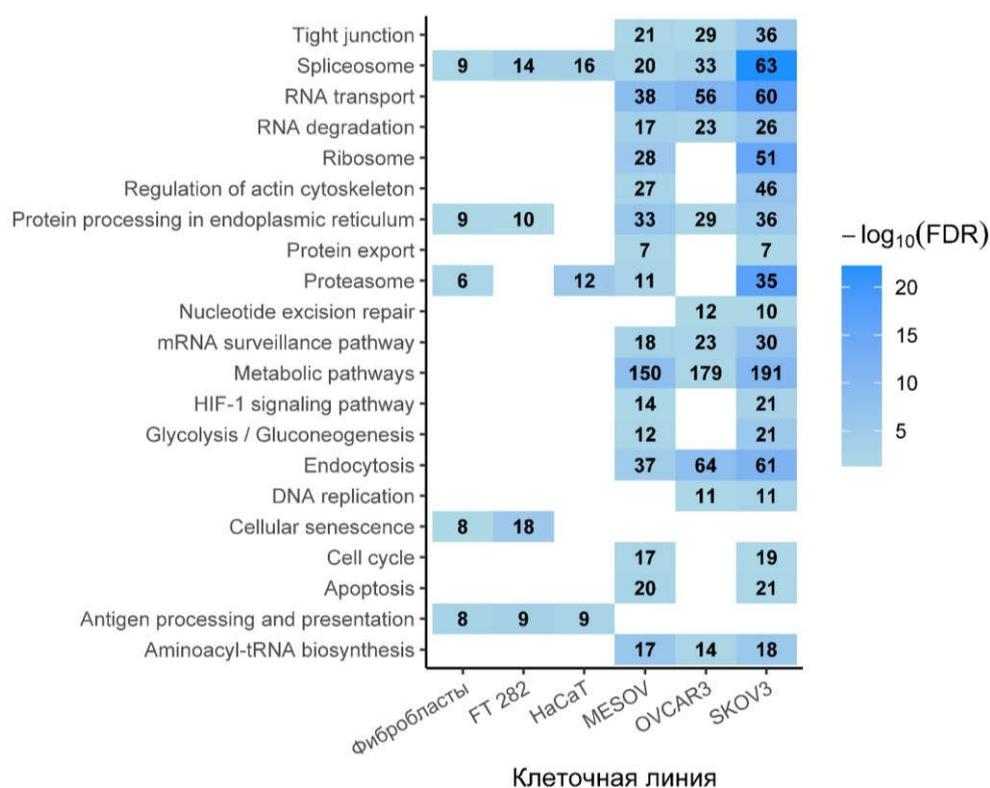


Рисунок 9. Функциональная аннотация белков, повышающих свою представленность в ApoS относительно контрольных секретомов ($\text{Log}_2\text{FoldChange} \geq 1$). Числа в ячейках соответствуют числу белков, цвет отображает частоту ложных открытий (FDR). Результаты обогащения были получены с использованием базы данных KEGG.

Опухолевые клетки в целом характеризовались более разнообразными профилями секреции по сравнению с нормальными клетками. Функциональная аннотация белков, повысивших свою представленность в ApoS, выявила, что в ответ на ХТ опухолевые клетки секретируют белки, относящиеся к сплайсосоме, и белки, участвующие в репарации ДНК, клеточном цикле и метаболизме. Секретомы нормальных клеток, в свою очередь, содержат белки, участвующие в иммунных

каскадах и процессе старения. Всё это говорит о более бедном составе секретомов нормальных клеток как по общему разнообразию белков, так и по функциональным обогащениям (Рисунок 9).

6. Цитопротективный эффект секретомов зависит от процессов ядерного экспорта, везикулярного транспорта и апоптоза

Мы показали, что АпоС содержат значительное количество белков, локализованных в ядерном компартменте, включая белки сплайсосомы. Мы также предполагаем, что основным переносчиком сигнальных молекул от донорных клеток к реципиентным являются внеклеточные везикулы, а апоптоз является ключевым процессом, запускающим генерацию АпоС.

Для оценки вклада ядерного экспорта, везикулярного транспорта и апоптоза донорные клетки SKOV3 обрабатывали комбинацией одного из ингибиторов (37 нМ лептомицина В, 6 мкг/мл брэфельдина А или 50 мкМ Z-VAD-FMK, соответственно) и 40 мкМ цисплатина. Инкубация длилась 7 часов, после чего клетки промывали PBS и заменяли среду на бессывороточную. Секретомы собирали через 24 часа после начала обработки. Реципиентные клетки инкубировали с секретомами в течение 72 часов, затем добавляли цисплатин и продолжали инкубацию еще 48 часов. Далее проводили тест на цитотоксичность (МТТ-тест) для оценки влияния секретомов на чувствительность клеток к цисплатину (Рисунок 10).

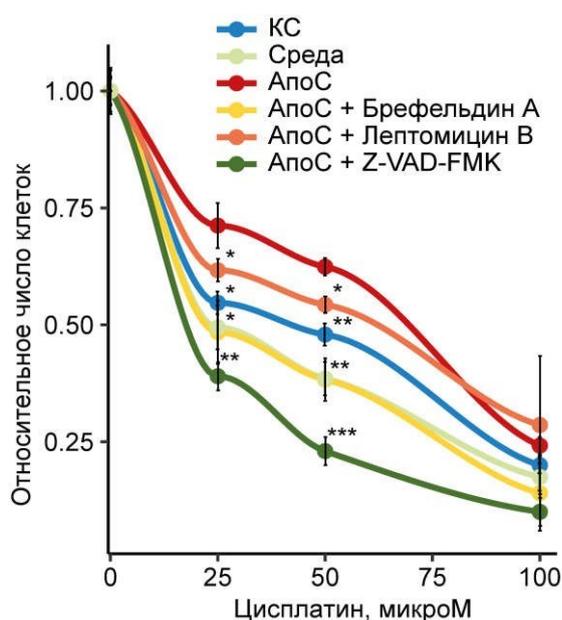


Рисунок 10. Результаты теста на цитотоксичность (МТТ-теста) реципиентных клеток SKOV3, прединкубированных с секретомами от погибающих клеток (АпоС) или контрольными секретомами (КС) на протяжении 72 часов и затем цисплатином на протяжении 48 часов. Донорные клетки обрабатывали или не обрабатывали цисплатином (40 мкМ) и комбинациями цисплатина (40 мкМ) с одним из ингибиторов (37 нМ лептомицина В, 6 мкг/мл брэфельдина А или 50 мкМ Z-VAD-FMK). Каждое измерение проведено в трех биологических повторах. Статистическая значимость была определена при помощи критерия Стьюдента, где “*” — p -value < 0,05; “**” — p -value < 0,005, “***” — p -value < 0,00005.

Было показано, что АпоС клеток с ингибированным ядерным экспортом повышал устойчивость реципиентных клеток к цисплатину в меньшей степени, чем АпоС клеток с активным ядерным экспортом белков. Эти данные подтверждают важную роль ядерно-цитоплазматического транспорта в формировании цитопротективного эффекта. Ингибирование везикулярного транспорта брэфельдином А полностью устраняло цитопротективный эффект секретомов, что указывает на необходимость экзосомального пути секреции для передачи сигнальных молекул. Подавление апоптоза с помощью Z-VAD-FMK приводило к тому, что секретомы становились токсичными для реципиентных клеток. Предполагается, что ингибирование апоптоза изменяет состав секретомов, возможно, способствуя накоплению поврежденных или токсичных компонентов. Напротив, активный апоптоз, вызванный цисплатином, формирует секретомы, содержащие факторы, способные индуцировать химиорезистентность в реципиентных клетках.

7. Белки сплайсосомы инкапсулированы во внеклеточные везикулы

Ранее мы продемонстрировали, что асцитные жидкости пациентов после ХТ и секретомы от погибающих опухолевых клеток обогащены компонентами сплайсосомы. Однако до настоящего времени не было доказано, что эти компоненты способны секретироваться во внеклеточное пространство. Существуют данные, что белки сплайсосомы участвуют в упаковке РНК в стрессовые гранулы и внеклеточные везикулы, но отсутствуют доказательства того, что эти белки могут секретироваться в составе везикул. Также было показано, что белки сплайсосомы участвуют в процессах, необходимых для формирования устойчивости к ХТ – репарации ДНК, регуляции клеточного цикла, расплетении R-петель и регуляции трансляции. Инкапсулирование белков сплайсосомы во внеклеточные везикулы повышает вероятность сохранения их функциональной активности. Мы предположили, что белки сплайсосомы в секретоме находятся во внеклеточных везикулах, а не в свободном виде.

Для проверки этой гипотезы мы получили секретомы от погибающих и контрольных клеток SKOV3 и обработали их протеиназой К. Изменение уровня белка в образцах после обработки позволяет оценить его доступность для протеиназы К и, следовательно, его инкапсулирование во внеклеточные везикулы. Как видно из Рисунка 11А, белки сплайсосомы DHX9, SYNCRIP, SRSF2 и SRSF3 не расщепляются

протеиназой К.

Также мы получили АпоС от клеток SKOV3, трансфицированных плазмидами, кодирующими флуоресцентно меченные белки сплайсосомы SNU13 или SRSF4 (pTagGFP2-SNU13 или pTagRFP-C-SRSF4, соответственно). После чего мы выделяли CD9-положительные внеклеточные везикулы из АпоС с помощью магнитных частиц. Проточная цитометрия полученных магнитных частиц, с преципитированными на их поверхности внеклеточными везикулами показала, что внеклеточные везикулы из АпоС действительно содержат флуоресцентно меченные белки SNU13-GFP и SRSF4-RFP (Рисунок 11Б).

Таким образом, можно сделать вывод, что белки сплайсосомы инкапсулированы во внеклеточные везикулы в составе секретомов от погибающих клеток.

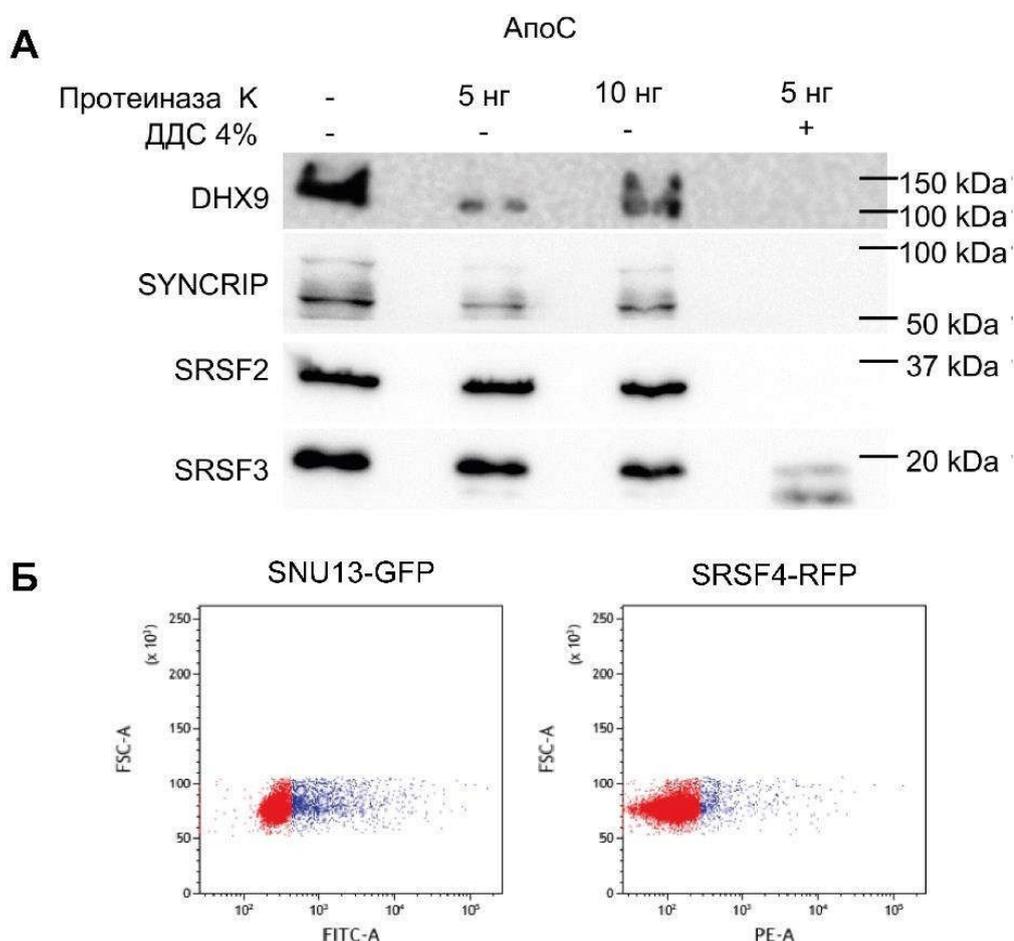


Рисунок 11. (А) Вестерн-блот секретомов от погибающих SKOV3. Образцы обрабатывали протеиназой К и додецилсульфатом натрия (ДДС), часть образцов оставляли интактными. (Б) Точечная диаграмма проточной цитометрии магнитных частиц, конъюгированных с CD9-положительными везикулами, полученными из секретомов от погибающих клеток. FSC – прямое светорассеяние, FITC-A или PE-A – интенсивность флуоресценции.

8. Секреты от погибающих клеток не приводят к изменению транскриптомного профиля в сторону более химиорезистентного фенотипа у клеток нормального эпителия

Мы показали, что, в отличие от опухолевых клеток, инкубация нормальных клеток с АпоС не приводит к формированию устойчивости к цисплатину (Рисунок 8). Для определения молекулярных каскадов, необходимых для формирования устойчивости, мы провели транскриптомный анализ нормальных клеток эпителия hTERT FT282, инкубированных с АпоС от опухолевых и нормальных клеток.

В результате анализа было обнаружено, что секреты от погибающих нормальных клеток значительно изменяют экспрессию генов в клетках нормального эпителия hTERT FT282, при этом АпоС от клеток SKOV3 практически не изменили профили экспрессии в нормальных клетках. Функциональная аннотация генов показала, что инкубация с аутологичными АпоС приводит к снижению экспрессии генов, связанных с репарацией ДНК и клеточным циклом, в то время как наблюдается активация генов, отвечающих за метаболические и иммунные каскады, а также за различные типы клеточной гибели (Рисунок 12).

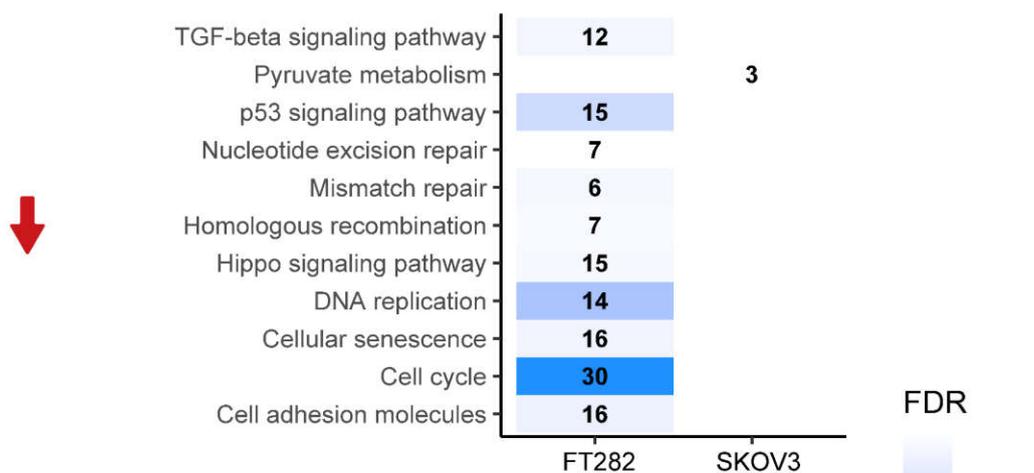
Таким образом видно, что нормальные клетки в ответ на сигналы от погибающих клеток замедляют процессы клеточного роста, в то время как опухолевые клетки (Рисунок 7), наоборот, активируют защитные функции, необходимые при повторном стрессовом воздействии. Вероятно, неопухолевые клетки, имеют более строгую регуляцию экспрессии генов, что ограничивает их способность значительно перестраивать свои сигнальные каскады в ответ на внешние стимулы.

9. Секреты от погибающих опухолевых клеток способствуют удлинению S-фазы клеточного цикла и возникновению устойчивости к ряду ДНК-повреждающих агентов

Результаты транскриптомного и протеомного анализов показали, что возникновение химиорезистентности в реципиентных опухолевых клетках связано с активацией экспрессии генов, регулирующих клеточный цикл. Мы предположили, что данные изменения сопровождаются изменениями самого клеточного цикла реципиентных клеток и проинкубировали клетки SKOV3 с секретами от погибающих или контрольных клеток в течение трех суток, после чего добавили 10 μ M

цисплатина на 24 часа и провели анализ клеточного цикла.

Гены, понижающие экспрессию



Гены, повышающие экспрессию

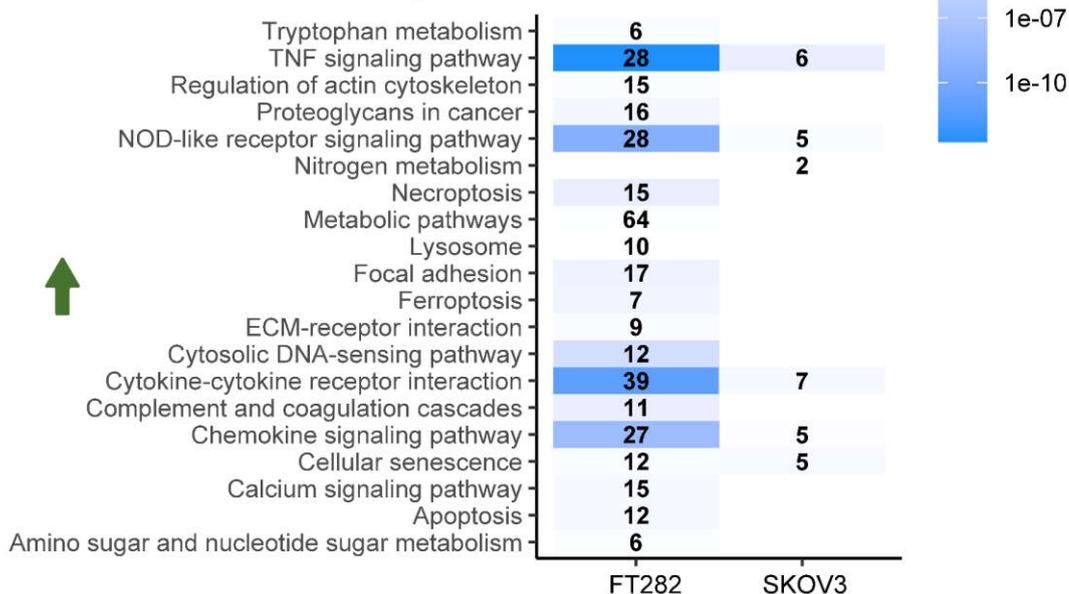


Рисунок 12. Функциональная аннотация генов, изменяющих свою экспрессию в реципиентных клетках hTERT FT282, инкубированных с ApoC от клеток hTERT FT282 или SKOV3 по сравнению с контрольными секретами от клеток hTERT FT282 ($|\text{Log}_2\text{FoldChange}| \geq 1$, $p\text{-val} < 0,05$). Числа в ячейках соответствуют числу генов, цвет отображает частоту ложных открытий (FDR). Результаты обогащения были получены с использованием базы данных KEGG.

Как видно из Рисунка 13, опухолевые клетки, прединкубированные с секретами от погибающих клеток, демонстрируют удлиненную S-фазу клеточного цикла, что дает клеткам больше времени на репарацию ДНК перед вступлением в МИТОЗ.

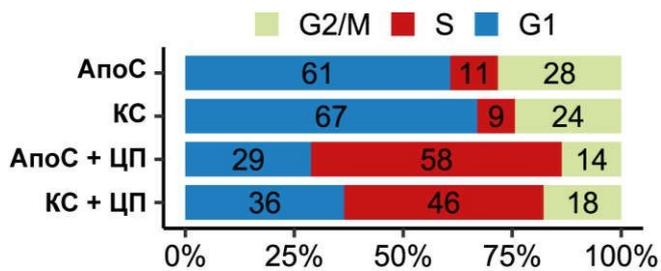


Рисунок 13. Результаты анализа клеточного цикла реципиентных клеток SKOV3, прединкубированных с АпоС или контрольными секретами на протяжении 72 часов и обработанных 10 μM цисплатина на протяжении 24 часов. Процентное соотношение фаз клеточного цикла было получено при помощи программного обеспечения проточного цитометра NovoExpress.

На протеомном и транскриптомном уровнях мы также показали, что АпоС активирует каскады репарации ДНК в реципиентных опухолевых клетках (Рисунок 7). Учитывая, что цисплатин является ДНК-повреждающим агентом, мы предположили, что АпоС может обеспечивать защиту и от других агентов, повреждающих ДНК, и при этом быть неэффективным при обработке химиопрепаратами других классов.

Для проверки этой гипотезы мы получили секретомов контрольных опухолевых клеток и клеток, погибающих от цисплатина, и добавили их к реципиентным опухолевым клеткам на 72 часа. Затем клетки обрабатывали различными химиопрепаратами на протяжении 48 часов, после чего был проведен МТТ-тест (Рисунок 14). Действительно, прединкубация с АпоС от погибающих под действием цисплатина клеток снижала чувствительность к другим ДНК-повреждающим агентам (доксорубицину и этопозиду), но не паклитакселу (препарату группы таксанов) или стауроспорину (ингибитору киназ), что говорит о том, что АпоС “подготавливает” реципиентные клетки к конкретному типу повреждений.

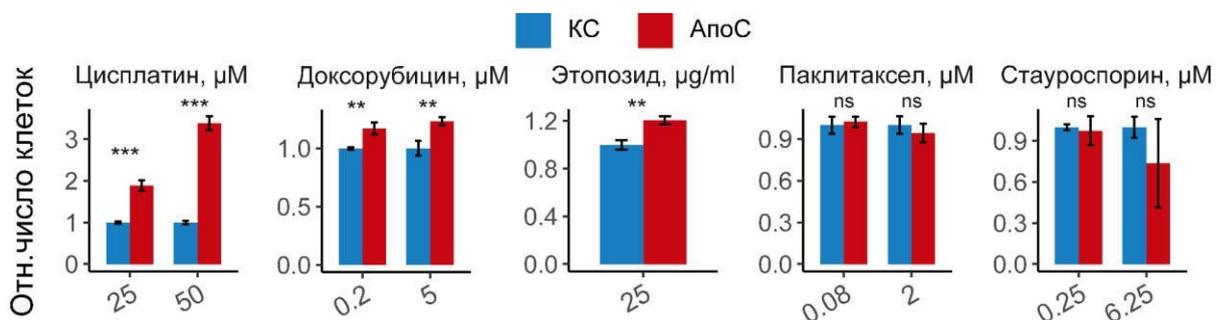


Рисунок 14. Результаты теста на цитотоксичность (МТТ-теста) реципиентных клеток SKOV3, прединкубированных с секретами от погибающих клеток (АпоС) или контрольными секретами (КС) на протяжении 72 часов и затем обработанных химиопрепаратами на протяжении 48 часов. Статистическая значимость была определена при помощи критерия Стьюдента, где “*” — $p\text{-value} < 0,05$; “***” — $p\text{-value} < 0,00005$.

10. Реципиентные опухолевые клетки, прединкубированные с АпоС, обладают более эффективным аппаратом репарации ДНК

Мы исследовали, как секреты погибающих клеток влияют на репарацию ДНК в клетках SKOV3. С помощью анализа ДНК-комет мы показали, что прединкубация реципиентных клеток с АпоС, снижает степень повреждения ДНК при последующем действии цисплатина по сравнению с контролем. Иммуноцитохимическое окрашивание сшивок платины и ДНК показало снижение числа сшивок в реципиентных клетках, прединкубированных с АпоС, в ответ на добавление цисплатина, что говорит о более эффективном устранении этих сшивок (Рисунок 15).

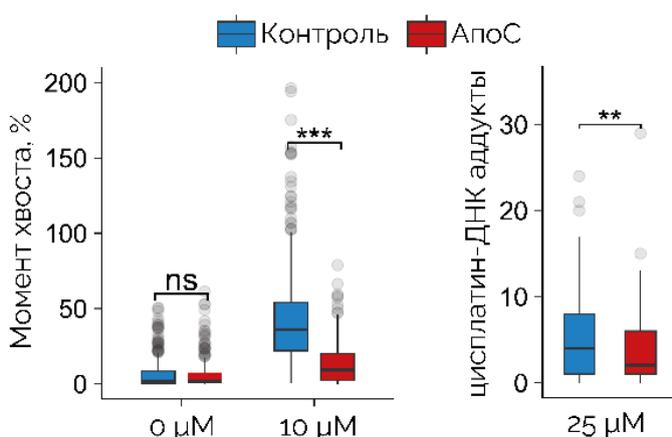


Рисунок 15. Момент хвоста (слева) и количество фокусов окрашивания сшивок цисплатин-ДНК (справа) в ядрах реципиентных клеток SKOV3, инкубированных с контрольными секретами или секретами от погибающих клеток (АпоС) и затем обработанными цисплатином на протяжении 48 и 24 часов, соответственно. Статистическая

значимость была определена при помощи критерия Стьюдента, где “**” — p -value < 0,005; “***” — p -value < 0,00005.

Анализ степени фосфорилирования гистона H2AX (γ H2AX) показал, что клетки, инкубированные с АпоС, быстрее реагируют на повреждение ДНК, что снижает вероятность клеточной гибели. Также отмечено снижение фосфорилирования белка RPA после воздействия цисплатина на эти клетки, что указывает на меньшее количество разрывов ДНК и сниженный репликативный стресс (Рисунок 16).

Полученные ранее протеомные данные показали увеличение представленности белков репарации ДНК в реципиентных опухолевых клетках после инкубации с АпоС. Мы провели вестерн-блот анализ реципиентных клеток для панели белков, необходимых для различных путей репарации ДНК (Рисунок 17).

FOXМ1 запускает транскрипцию генов, отвечающих за репарацию ДНК. Тирозил-ДНК-фосфодиэстераза I (TDP1) устраняет остатки тирозина, оставшиеся после действия топоизомеразы I, которые могут блокировать процесс репарации ДНК. ДНК-лигаза I (LIG1) восстанавливает целостность фосфодиэфирного остова ДНК, соединяя разрывы, возникшие в одной из цепочек ДНК. Rad51 – белок,

связывающийся с одноцепочечной ДНК в ходе гомологичной репарации.

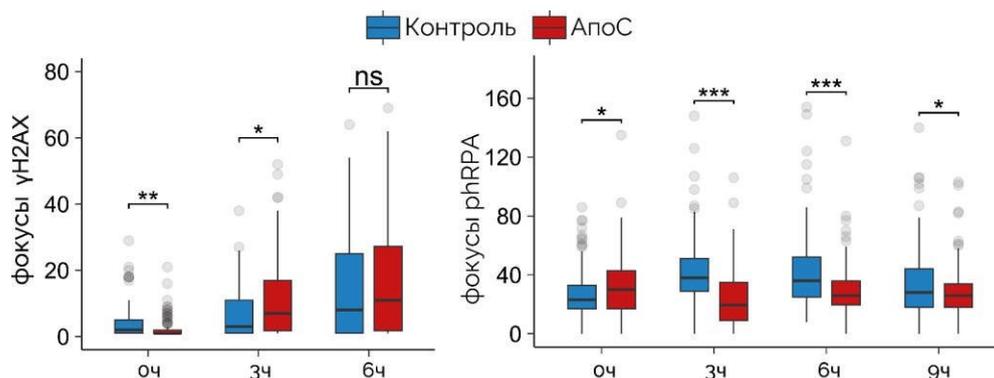


Рисунок 16. Количество фокусов γ H2AX (слева) и фосфорилированной формы RPA (справа) в ядрах реципиентных клеток, инкубированных с контрольными секретами или секретами от погибающих клеток (ApoC) и затем обработанными цисплатином (25 μ M) в течение указанного на оси X времени. Статистическая значимость была определена при помощи критерия Стьюдента, где “*” — p -value < 0,05; “***” — p -value < 0,0005; “****” — p -value < 0,00005.

Хорошо заметно, что ApoC повышают представленность всех проанализированных белков, необходимых для успешной репарации ДНК. Интересно, что этот эффект мы наблюдаем без добавления цисплатина к реципиентным клеткам. На основании полученных данных, можно сделать вывод, что ApoC повышает устойчивость реципиентных клеток к повреждению ДНК за счёт предварительного повышения базового уровня белков, отвечающих за репарацию ДНК. Тем самым реципиентная клетка сокращает время ответа на повреждение ДНК за счёт отсутствия затрат на транскрипцию и трансляцию необходимых ей белков, что повышает её шансы на выживание.

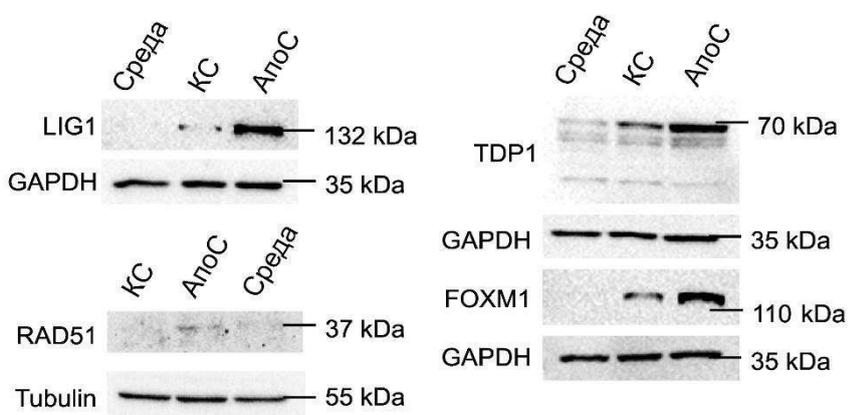


Рисунок 17. Вестерн-блот реципиентных опухолевых клеток, инкубированных с секретами от погибающих клеток (ApoC), контрольными секретами (КС) или культуральной средой на протяжении 72 часов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Формирование устойчивости к химиотерапии является одной из основных проблем противоопухолевого лечения. В литературе широко описаны механизмы возникновения резистентности, однако данные работы сосредоточены на событиях, происходящих в масштабах одной клетки и не учитывают изменение пула сигнальных молекул, окружающих клетку. В ходе данной работы была проведена оценка вклада изменяющейся на фоне ХТ межклеточной коммуникации в возникновение химиорезистентности злокачественных опухолей яичника. Преимуществом этого исследования является возможность наблюдать процесс становления химиорезистентности как в условиях *ex vivo* (в ходе экспериментов с первичными культурами клеток и асцитными жидкостями), так и *in vitro* (в ходе экспериментов с кондиционными средами). Так, было показано, что межклеточная коммуникация, изменяющаяся на фоне ХТ, приводит к формированию более устойчивой к терапии популяции опухолевых клеток. В то же время, на моделях *in vitro* удалось обнаружить возможный механизм формирования химиорезистентности. Погибающие апоптозом опухолевые клетки секретируют во внеклеточное пространство ряд молекул (в том числе белков сплайсосомы), инкапсулированных во внеклеточные везикулы. Эти внеклеточные везикулы приводят к глобальной перестройке внутриклеточных молекулярных каскадов, связанных с регуляцией клеточного цикла (а именно удлинение S-фазы при воздействии цисплатина), а также активация путей репарации ДНК в реципиентных опухолевых клетках. Более того, в ходе данной работы были определены особенности данного явления: i) приобретенная химиорезистентность сохраняется только при постоянной передаче сигнала от погибающих клеток; ii) секретомов опухолевых клеток, погибающих под действием ДНК-повреждающего агента цисплатина, приводят к устойчивости только к ДНК-повреждающим агентам.

Полученные результаты расширяют знания о поведении опухоли в ответ на ХТ и механизмах возникновения химиорезистентности, а также могут лечь в основу разработки новых комбинированных терапевтических стратегий, нацеленных на подавление межклеточной коммуникации опухолевых клеток и предотвращающих формирование химиорезистентности.

ВЫВОДЫ

1. Секретомы от погибающих под действием химиотерапии опухолевых клеток приводят к формированию устойчивости опухолевых клеток к цисплатину *ex vivo* и *in vitro*.
2. Межклеточная коммуникация, опосредованная химиотерапией, не приводит к возникновению устойчивости к цисплатину у клеток эпителия фаллопиевой трубы hTERT FT282, кератиноцитов HaCaT и дермальных фибробластов.
3. Погибающие под действием цисплатина опухолевые клетки секретируют белки сплайсосомы, такие как DHX9, SYNCRIP, SRSF2, SRSF3, SRSF4, SNU13 и другие в составе внеклеточных везикул.
4. Секретомы от погибающих под действием цисплатина клеток повышают эффективность репарации ДНК в реципиентных опухолевых клетках, заранее подготавливая их к последующему действию химиотерапии.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ

Статьи, опубликованные в журналах Scopus, WoS

1. Shender V.O., Anufrieva K.S., Shnaider P.V., Arapidi G.P., Pavlyukov M.S., Ivanova O.M., Malyants I.K., Stepanov G.A., Zhuravlev E., Ziganshin R.H., Butenko I.O., Bukato O.N., Klimina K.M., Veselovsky V.A., Grigorieva T.V., Malanin S.Y., Aleshikova O.I., Slonov A.V., Babaeva N.A., Ashrafyan L.A., Khomyakova E., Evtushenko E.G., Lukina M.M., Wang Z., Silantiev A.S., Nushtaeva A.A., Kharlampieva D.D., Lazarev V.N., Lashkin A.I., Arzumanyan L.K., Petrushanko I.Y., Makarov A.A., Lebedeva O.S., Bogomazova A.N., Lagarkova M.A., Govorun V.M. Therapy-induced secretion of spliceosomal components mediates pro-survival crosstalk between ovarian cancer cells // Nature communications. – 2020. – Vol.15(1). – P.1-26. Импакт-фактор WoS (JIF) = 14.7 (3.003/0.9)*
2. Shnaider P.V., Petrushanko I.Y., Aleshikova O.I., Babaeva N.A., Ashrafyan L.A., Borovkova E.I., Dobrokhotova J.E., Borovkov I.M., Shender V.O., Khomyakova E. Expression level of CD117 (KIT) on ovarian cancer extracellular vesicles correlates with tumor aggressiveness // Frontiers in cell and developmental biology. – 2023. – Vol.11 – P.1-9. Импакт-фактор WoS (JIF) = 4.6 (1.04/0.5)*
3. Shnaider P.V., Ivanova O.M., Malyants I.K., Anufrieva K.S., Semenov I.A., Pavlyukov M.S., Lagarkova M.A., Govorun V.M., Shender V.O. New insights into therapy-induced progression of cancer // International journal of molecular sciences. – 2020. – Vol. 21(21) – P.1-29. Импакт-фактор WoS (JIF) = 4.9 (3.35/1.3)*

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

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АпоС – секретом погибающих клеток, **ДНК** – дезоксирибонуклеиновая кислота, **КС** – секретом контрольных клеток, **ЛД50** – полулетальная доза, **МТТ** — тиазолил синий тетразолий бромид / тест на цитотоксичность, **РНК** — рибонуклеиновая кислота, **ХТ** – химиотерапия, **FDR** – частота ложных открытий, **GSEA** – анализ обогащения по наборам генов (gene set enrichment analysis), **NTA** – анализ треков наночастиц, **PBS** – фосфатно-солевой буфер.