

Секция IV

СИГНАЛЬНЫЕ КАСКАДЫ В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ

Влияние малой ГТФазы Arf6 на динамику роста клеток глиобластомы и немелкоклеточного рака легкого

А.Ю. Журавская, А.Д. Еникеев, К.Б. Соколинский,
А.В. Комельков, И.Б. Зборовская, Е.М. Чевкина

ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва

Введение. Малая ГТФаза Arf6 известна своим участием в опухолевой прогрессии за счет регуляции везикулярного транспорта и изменения цитоскелета. Однако в литературных источниках отсутствуют сведения о воздействии Arf6 на пролиферацию клеток человека и ее влиянии на сигнальные пути, регулирующие пролиферативный потенциал клетки, — в частности на mTOR- и ERK1/2-зависимые сигнальные каскады. **Целью** данной работы было определение роли малой ГТФазы Arf6 в пролиферативной активности клеток глиобластомы и немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ) человека и участия данного белка во внутриклеточных сигнальных путях, ассоциированных с ростом клеток.

Материалы и методы. В работе использовались клеточные линии глиобластомы (LN229 и U87) и линии НМРЛ (A549 и H1299), в которых проводили направленную модификацию экспрессии Arf6. Производные линии с гиперэкспрессией белка Arf6 дикого типа (Arf6 WT), а также с экспрессией конститутивно активной формы белка Arf6 (Arf6 Q67L) получали методом ретровирусной инфекции. Производные линии с подавлением эндогенной экспрессии гена *Arf6* получали при помощи экспрессии 2 различных последовательностей малых шпилечных РНК (shRNA) с использованием метода лентивирусной инфекции. Динамику клеточного роста оценивали методом прямого подсчета в камере Горяева, способность к автономному росту — в тесте на клоногенность. Экспрессию и статус фосфорилирования исследуемых белков анализировали методом вестерн-блот-гибридизации. Анализ ак-

тивности фосфолипазы D осуществляли с помощью коммерческого кита Amplex® Red Phospholipase D Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, США). Клеточный цикл изучали методом проточной цитофлуориметрии. Анализ активности протеиназ, расщепляющих внеклеточный матрикс, — матриксных металлопротеиназ MMP2 и MMP9, активаторов плазминогена uPA и tPA — проводили методом субстрат-специфичной зимографии в полиакриламидном геле.

Результаты. Впервые обнаружена Arf6-зависимая стимуляция пролиферации клеток глиобластомы. Показано, что гиперэкспрессия Arf6 увеличивает динамику клеточного роста как в условиях стандартного клеточного микроокружения, так и в условиях автономного роста, а подавление эндогенного Arf6 снижает пролиферацию, стимулирует апоптоз и уменьшает долю клеток, находящихся в S-фазе клеточного цикла. Впервые показано, что экспрессия Arf6 в клетках глиобластомы приводит к стимуляции mTOR-зависимого сигнального пути, включая активацию основной мишени mTOR — киназы рибосомального белка S6 (p70S6K), а также последующих эффекторов сигнального пути mTOR: рибосомального белка S6 и белка 4E-BP1, участвующих в инициации трансляции. Обнаруженная Arf6-зависимая стимуляция является альтернативным механизмом активации mTOR-сигнального пути, не зависящим от сигнального каскада PI3K-Akt. Белок Arf6 участвует в негативной регуляции ERK1/2 в клетках глиобластомы — уровень активирующего фосфорилирования ERK1/2 обратно пропорционален уровню экспрессии Arf6 в клетке. Конститутивная активация Arf6 в клетках глиобластомы усиливает активность фосфолипазы D (PLD). Впервые показано, что Arf6 стимулирует пролиферацию и автономный рост клеток НМРЛ и активирует в них mTOR-зависимый сигнальный путь. Выявлено усиление секреции MMP9 при гиперэкспрессии Arf6 в клетках A549 и снижение секреции MMP2 при нокдауне *Arf6* в клетках глиобластомы.

Выводы. В работе впервые обнаружено, что Arf6 стимулирует пролиферацию и автономный рост клеток

глиобластомы и НМРЛ, а также активирует mTOR-зависимый сигнальный путь. Показано, что в клетках глиобластомы Arf6 играет негативную роль в регуляции активности протеинкиназы ERK1/2. Подтверждено значение активации Arf6 в стимуляции активности фосфолипазы D. Выявлено положительное влияние Arf6 на секрецию отдельных протеиназ внеклеточного матрикса.

Влияние исследуемых цитостатиков К-1, К-2, К-30 на активность Pdr5p интактных и резистентных клеток *Saccharomyces cerevisiae* и экспрессию MDR2 саркомы 180

А.А. Ибрагимов, О. Касымов, З.М. Еникеева,
И.В. Карпышева

РОНЦ Минздрава Республики Узбекистан, Ташкент

На клетках дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (модели для изучения биологии клеток млекопитающих) были проанализированы механизмы действия цитотоксинов: камптотецина — ингибитора топоизомераз I и II; верапамила, резерпина, цефалоспоринов, являющихся модуляторами трансмембранного белка Pgp, и т. д.

Цель исследования заключалась в изучении влияния новых производных трополоновых алкалоидов К-1, К-2 и К-30 на модулирование активности лекарственного транспортера Pdr5p модельных клеток *S. cerevisiae* и саркомы 180.

Материалы и методы. Получены модели клеток *S. cerevisiae*, резистентных к К-1, К-2 и К-30 в дозах 40, 100 и 9 мкг/мл соответственно; в качестве сравнения были выбраны этопозид (15 мкг/мл) и доксорубин (1,8 мкг/мл). Рост клеток каждого исследуемого варианта анализировали в чашках Петри на твердой среде для дрожжей *S. cerevisiae*, на интактной среде и средах, содержащих указанные концентрации препарата. Уровень Pdr5p анализировали по количеству роста колоний клеток под воздействием исследуемого препарата против контрольного варианта. Для оценки межнуклеосомной деградации ДНК выделенные препараты ДНК анализировали посредством электрофореза. Для исследования влияния исследуемых препаратов на экспрессию гена *MDR2* из опухолевой ткани саркомы 180 под воздействием каждого препарата были получены тотальные препараты РНК. Затем методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) были получены мРНК и синтезированы комплементарной ДНК.

Результаты. Показано, что К-1, К-2 и К-30 ингибируют рост интактных клеток дрожжей в пределах 65–80 % (этопозид — в пределах 40 %). На резистентных клетках *S. cerevisiae* К-1 на 1-е и 3-и сутки инги-

бирует их рост на 35 и 36,7 %; К-2 — на 30 и 18,2 %; К-30 — на 55 и 37,5 %; соответственно. Этопозид как на 1-е, так и на 3-и сутки способствует росту резистентных клеток выше контроля, в пределах 20–25 %. На опухолевой ткани саркомы 180 методом ОТ-ПЦР показано, что К-1 и К-30 подавляют экспрессию *MDR2* в пределах 80 %, а К-2 и этопозид — на 65 и 70 % соответственно.

Выводы. Новые препараты К-1, К-2 и К-30 не способствуют развитию множественной лекарственной устойчивости, обусловленной как Pdr5p *S. cerevisiae*, так и геном *MDR2* саркомы 180, по-видимому, из-за межнуклеосомной деградации и фрагментации ДНК. Результаты экспериментов свидетельствуют о том, что *S. cerevisiae* являются удобной моделью для изучения множественной лекарственной устойчивости.

Работа поддержана грантом
Республики Узбекистан ФДСС 12.7.

Иммуногистохимический анализ экспрессии генов *p53*, *Bcl2*, *Ki-67* в опухолевых клетках больных ретинобластомой

З.С. Исламов¹, Н. Отаева¹, М.С. Гильдиева¹,
А.А. Абдувалиев²

¹РОНЦ Минздрава Республики Узбекистан, Ташкент;

²Ташкентская медицинская академия,
Республика Узбекистан

Поиск дополнительных причин трансформации клеток способствовал проведению исследований по изучению кооперативного взаимодействия генов *p53*, *Bcl2* и *Ki-67* и их роли в процессе возникновения и развития ретинобластомы (РБ).

Ядерный белок гена *p53* является одним из регуляторов клеточного цикла, он блокирует его на стадии G1/S, что не позволяет клетке с геномными нарушениями ДНК произвести дальнейшую ее репликацию. Мутации этого гена приводят к отключению апоптоза.

Bcl2 — антиапоптотический ген митохондриальной мембраны. Он кодирует белок, который подавляет апоптоз; гиперэкспрессия онкобелка Bcl-2 ассоциируется с хромосомной транслокацией t(14.18).

Ki-67 избирательно экспрессируется на пролиферирующих клетках во время клеточного цикла (G1, S, G2 и M). Существует строгая позитивная корреляция между высоким индексом Ki-67 и гистологией неоплазий высокой степени.

Нами проведен иммуногистохимический анализ 50 образцов опухолевой ткани больных РБ. В 38 (76 %) образцах выявлена положительная реакция на наличие мутантного гена *tp53*, экспрессия гена *Bcl2* наблюдалась в 22 (44 %) образцах, положительная реакция на наличие *Ki-67* — в 92 % образцов.

Анализ полученных результатов показал, что у 76 % обследованных больных наблюдается разблокирование клеточного цикла за счет появления мутантного гена *p53* (*mtp53*). Поэтому клетки с генными и геномными нарушениями продолжают делиться, о чем свидетельствует наличие высокой экспрессии *Ki-67*.

Следовательно, пролиферативной активностью обладает подавляющее большинство опухолевых образцов больных РБ. Отсутствие нормального (дикого — *wtp53*) гена апоптоза, возможно, приводит к снижению экспрессии антиапоптотического гена *Bcl2*, который ингибирует апоптоз в клетках РБ.

Таким образом, выявлена роль генов апоптоза и пролиферации в развитии РБ, дальнейшие исследования в этой области позволят установить новые механизмы возникновения РБ, открыть новые мутации в гене-супрессоре *RBI* и генах-кандидатах, участвующих в активации опухолевого процесса в клетках сетчатки.

Экспрессия потенциальных генов-маркеров при диссеминированном раке желудка

Ф.М. Кипкеева¹, М.Н. Нариманов², Т.А. Музаффарова¹,
О.А. Малехова², А.В. Карпухин¹

¹ФГБНУ МГНЦ, Москва;

²ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва

Среди большого количества молекулярно-генетических показателей, которые могут влиять на клиническое течение рака желудка (РЖ), особое место отводится поиску маркеров, связанных с метастазированием. Высокая частота выявления РЖ уже на поздних стадиях развития требует разработки маркеров для проведения персонализированной системной терапии.

Изучали количественные профили экспрессии набора генов — потенциальных маркеров (*VEGF*, *VEGFR1*, *VEGFR2*, *NRP-1*, *bFGF*, *FGFR2*, *TGF-β*, *HER-2/neu*, *TUBB*, *BRCA1*, *Ki-67*, *PCNA*) методом количественной полимеразной цепной реакции в реальном времени в парных образцах опухоль—норма при диссеминированном РЖ (ДРЖ). Также анализировали наличие корреляций в уровнях экспрессии изученных генов. Наиболее часто повышенный уровень мРНК в опухоли по отношению к контролю наблюдался для генов *TGF-β* и *NRP-1* (в 41 и 32 % случаев соответственно). Экспрессия этих генов представляет существенный интерес как вследствие их значения для прогрессии и метастазирования рака, так и высокой частоты ее повышения. Впервые при РЖ обнаружена корреляция уровней экспрессии *NRP-1* и *TGF-β*. Найденная коэкспрессия может отражать в качестве некоторых вероятных механизмов необходимость ко-рецепторных взаимодействий этих генов либо связки сигналь-

ного пути *TGF-β* с путем *Hedgehog* для обеспечения прогрессирования опухоли при ДРЖ. Интересно, что экспрессия обоих этих генов коррелирует с экспрессией гена *VEGFR2*, повышенной в 32 % случаев. Как известно, рецепторы *VEGFR2* и *NRP-1* способны взаимодействовать между собой, что может усиливать ангиогенный эффект их стимуляции. Видимо, координация экспрессии генов *TGF-β*, *NRP-1* и *VEGFR2* связана с высоким метастатическим потенциалом прогрессирующей опухоли при ДРЖ.

Неожиданным было обнаружение обратной корреляции экспрессии генов *VEGF* и *bFGF*. Хотя оба эти фактора обладают стимулирующими ангиогенез свойствами, спектр экспрессирующихся под их воздействием генов различен. Данные, указывающие на непосредственную взаиморегуляцию этих генов, не найдены. Скорее всего, выявленный эффект отражает альтернативные пути стимуляции развития ДРЖ, и его необходимо учитывать при выборе средств таргетной терапии этого заболевания.

Анализ экспрессии генов системы пробелокконвертаз в опухолях легкого и пищевода человека

А.А. Комиссаров¹, С.И. Кошечкин¹, А.В. Сассе²,
А.И. Тарасова³, А.В. Шубин^{1,3}

¹ФГБУН «Институт молекулярной генетики РАН», Москва;

²ФГБУН «Институт биоорганической химии

им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН», Москва;

³ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва

Пробелокконвертазы (ПБК) — семейство высокоспецифичных субтилизин-подобных сериновых эндопептидаз млекопитающих, основная функция которых заключается в процессинге различных белков и пептидов. Интерес к изучению данных ферментов вызван тем, что ПБК, активируя ключевые опухоль-ассоциированные белки, влияют на способность злокачественных клеток к пролиферации, миграции и преодолению межтканевых барьеров. Установлено, что уровень экспрессии генов ПБК в опухолевых клетках изменен. Кроме этого, обнаружены корреляции экспрессии некоторых ПБК с агрессивностью опухолей, нейроэндокринным фенотипом злокачественных клеток и послеоперационной выживаемостью пациентов. Эти данные позволяют рассматривать ПБК в качестве маркеров для классификации опухолей и прогноза течения онкологических заболеваний, а также как потенциальные мишени для терапии.

В данной работе впервые методом количественной полимеразной цепной реакции была определена экспрессия всех генов ПБК на уровне мРНК в опухолевых и окружающих нормальных тканях, полученных от 30 пациентов с диагнозом «рак легкого» и 19 пациентов с диагнозом «рак пищевода». Обнаружены ста-

тистически значимые изменения экспрессии генов некоторых ПБК: в опухолях легких — повышение уровня мРНК гена *FURIN* и снижение *PCSK2*, *PCSK5*, *PCSK7*, *PCSK9* и *MBTPS1*; в опухолях пищевода — повышение уровня мРНК генов *FURIN*, *PCSK9* и *MBTPS1*. При этом корреляции между экспрессией ПБК и имеющимися клиническими характеристиками опухолей не выявлены. Кластерный анализ паттернов изменений экспрессии генов ПБК в опухоли относительно нормальной ткани позволил выявить 4 типа образцов. Для 3 из них, охватывающих около 80 % всей выборки, показано наиболее сильное повышение экспрессии в опухоли 1 из 3 генов ПБК: *FURIN*, *PCSK1* или *PCSK6*. Четвертый тип более гетерогенен.

Таким образом, экспрессия генов ПБК в злокачественных опухолях легкого и пищевода человека изменена, причем изменения происходят по нескольким основным сценариям, что, по-видимому, отражает ранее неизвестные свойства опухолей.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект № 14-04-31395).

Роль сигнальных путей, контролируемых белком KIT, в выживании клеток нейробластомы

Т.Д. Лебедев¹, П.В. Спирин¹, А.А. Буздин², В.С. Прасолов¹

¹ФГБУН «ИМБ им. В.А. Энгельгардта РАН», Москва;

²Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева, Москва

Протеинкиназы регулируют активность многих сигнальных путей, отвечающих за выживание клеток нейробластомы (НБ), поэтому они рассматриваются как перспективные терапевтические мишени для лечения НБ. В большинстве случаев НБ выявляется экспрессия рецепторной тирозинкиназы KIT. Ее гиперэкспрессия связана с увеличением экспрессии MYCN и, в конечном счете, неблагоприятным исходом. Тем не менее окончательно не ясна роль KIT в развитии НБ и поддержании злокачественного статуса клеток. Для установления роли KIT в выживаемости клеток НБ мы подавляли экспрессию гена *c-kit* методом РНК-интерференции в 2 линиях клеток НБ с различными уровнями экспрессии данного гена: SH-SY-5Y и SK-N-AS (в SH-SY-5Y выявлено в 10 раз больше мРНК *c-kit*, чем в SK-N-AS). Для подавления экспрессии *c-kit* использовали лентивирусные векторы, направляющие экспрессию малой шпилечной РНК (shRNA) против мРНК *c-kit* (shKIT) и неспецифической контрольной shRNA (shSCR). Было проведено транскриптомное профилирование, чтобы определить, какие сигнальные пути регулируются KIT в клетках НБ и приводят к гибели клеток после подавления гена *c-kit*, а также выявить изменения в сигнальных путях, которые могут позволить некоторым клеткам НБ выжить после

подавления *c-kit*. Мы провели профилирование на 3-й день после трансдукции лентивирусными векторами, когда еще не наблюдалось никаких существенных изменений в пролиферации трансдуцированных SH-SY-5Y; на 6-й день, когда клетки SH-SY-5Y с подавленным *c-kit* начали погибать; и через 2 нед, когда получили стабильную линию клеток SH-SY-5Y, в которых подавлена экспрессия гена *c-kit* (SH-SY-5Y shKIT). Никаких существенных изменений в пролиферации клеток линии SK-N-AS после подавления *c-kit* не наблюдалось.

Работа выполнена при поддержке

Федеральной целевой программы

«Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технического комплекса России на 2014–2020 годы» (соглашение о предоставлении субсидии № 14.604.21.0030).

Белок PRAME функционирует как мембранный ауторецептор

В.А. Мисюрин¹, А.В. Мисюрин¹, Н.А. Лыжко¹, Т.В. Ахлынина¹,
А.Е. Мисюрина², Ю.П. Финашуткина¹, Л.А. Кесаева¹,
А.В. Пономарёв¹, М.А. Барышникова¹, О.С. Бурова¹

¹ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва;

²ФГБУ «Гематологический научный центр»

Минздрава России, Москва

Белок PRAME является важным компонентом убиквитинкиназы Cullin2. Он участвует в убиквитинировании многих белков, в том числе RARα. Кроме того, PRAME активирует экспрессию генов, ответственных за пролиферацию и блокирующих дифференцировку клетки, и инактивирует экспрессию проапоптотического гена *TRAIL*. Экспрессия *PRAME* при онкологических заболеваниях оказывает негативное влияние на прогноз. В нескольких работах сообщается, что ген *PRAME* может быть активирован бактериальными липополисахаридами и пептидогликанами. Активацию гена связывают с наличием неизвестного мембранного рецептора, распознающего бактериальные детерминанты. В работе Williams и соавт. (1998) указано, что гонокки используют поверхностные белки OIPs человека для проникновения внутрь клеток. Ген одного из OIPs, согласно данным Williams и соавт., идентичен гену *PRAME*.

Цель работы — показать, что гипотетическим рецептором на поверхности клетки является сам белок PRAME.

Материалы и методы. Клеточные линии K562, W138 и W138, трансфицированная геном *PRAME* (W138-PRAME), были проинкубированы с анти-PRAME-антителами и вторичными окрашенными антителами. Методом проточной цитофлуориметрии на цитометре FACSCantoII была определена степень связывания анти-PRAME-антител с клетками крови 2 больных

В-клеточным хроническим лимфоцитарным лейкозом и 1 большого множественной миеломой. Клетки линий NOMO1 и THP1 были проинкубированы с анти-PRAME-антителами. Уровень экспрессии PRAME в культурах клеток K562, NOMO1, WI38, WI38-PRAME и THP1 и у больных была определен методом полимеразной цепной реакции в реальном времени.

Результаты и обсуждение. С помощью вторичных окрашенных антител и проточной цитометрии показано, что анти-PRAME-антитела связываются поверхностью PRAME-экспрессирующих клеток K562 и WI38-PRAME и клеток больных. Нетрансфицированные клетки WI38 не имели на поверхности белка PRAME и не связывали антитела. Таким образом, мы показали поверхностную локализацию PRAME. Связывание анти-PRAME-антител с поверхностью клеток линий NOMO1 и THP1 вызывало значительное (на порядок) повышение уровня экспрессии PRAME относительно контроля, что доказывает способность белка PRAME, находящегося на поверхности клетки, связываться с субстратом и активировать экспрессию собственного гена.

Роль сигнальной функции интегрина $\alpha 5 \beta 1$ в механизмах апоптоза и лекарственной резистентности опухолевых клеток

Г.Е. Морозевич¹, Н.И. Козлова¹, О.Ю. Сусова²,
Н.А. Ушакова¹, Н.М. Геворкян¹, А.Е. Берман¹

¹ФГБУ «ИБМХ им. В.Н. Ореховича», Москва;

²ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва

Опухолевые клетки при злокачественной прогрессии приобретают свойства, в основе которых лежат модификации сигналов, инициируемых внеклеточным матриксом. Одним из таких свойств является резистентность к различного рода стрессам, в частности к апоптозу — апоптозу, индуцируемому нарушением матрикс-клеточных контактов, устойчивость к лекарственным препаратам и др.

Основными посредниками в проведении сигналов от матрикса в клетку являются интегрины, и их роль в ответе клеток на стрессовые ситуации продемонстрирована многими исследователями (Chiarugi P., Giannoni E., 2008; Desgrosellier J.S., Cheresh D.A., 2010; Morozovich G.E. et al., 2006). Однако пути передачи интегрин-опосредованных сигналов, контролирующих апоптоз и лекарственную резистентность, требуют дальнейшего изучения.

Ранее мы показали, что клетки резистентной к доксорубину линии MCF-7Dox, производной от доксорубин-чувствительной линии MCF-7 карциномы молочной железы человека, отличаются от последней резким снижением экспрессии интегрин $\alpha 2 \beta 1$, уве-

личением экспрессии интегрин $\alpha 5 \beta 1$, более высокой инвазивной активностью и резистентностью к апоптозу (Morozovich G.E. et al., 2008). Согласно недавним полученным нами результатам, подавление экспрессии рецептора $\alpha 5 \beta 1$ в указанных клетках специфической малой интерферирующей РНК оказывает стимулирующий эффект на субстрат-зависимый апоптоз (апоптоз) и повышает чувствительность клеток к доксорубину. Торможение экспрессии $\alpha 5 \beta 1$ сопровождается резким ингибированием активности сигнальных фосфокиназ Akt и Erk2. Полученные данные свидетельствуют об общности интегрин-опосредованных сигнальных механизмов, контролирующих апоптотическую гибель клеток при различных стрессовых воздействиях.

Исследования поддержаны РФФИ (проекты № 14-04-00783, № 15-04-05511).

Количество CD14⁺HLA-DR^{low/-}-клеток влияет на количество PRAME-положительных опухолевых клеток в крови больных онкогематологическими заболеваниями

А.В. Пономарёв¹, В.А. Мисюрин¹, Е.Н. Мисюрина²,
Л.С. Маврина², Е.Ю. Гришина², М.Н. Стрекова²,
Е.А. Пенская³, О.С. Бурова¹, А.Н. Иншаков¹,
М.А. Барышникова¹, А.В. Мисюрин¹

¹ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва;

²ГБУЗ ГКБ № 52 ДЗМ;

³ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России, Москва

В норме у большинства здоровых людей на поверхности примерно 80 % моноцитов наблюдается коэкспрессия CD14 и HLA-DR. При онкогематологических заболеваниях снижается количество моноцитов, экспрессирующих HLA-DR. Описана популяция миелоидных супрессоров с фенотипом CD14⁺HLA-DR^{low/-}. Данные клетки подавляют противоопухолевый иммунитет, в связи с чем можно ожидать увеличение опухолевой массы у больных онкогематологическими заболеваниями. Поскольку опухолевые клетки часто экспрессируют белок PRAME, можно оценивать их количество по данному маркеру.

Цель работы — оценить количество миелоидных супрессоров и опухолевых клеток в крови у больных множественной миеломой и пациентов с грибовидным микозом по сравнению со здоровыми донорами.

Материалы и методы. Методом проточной цитофлуориметрии на цитометре FACSCantoII с помощью антител к HLA-DR, CD14 и PRAME было определено количество миелоидных супрессоров и опухолевых клеток у 3 первичных больных множественной миело-

мой и 2 первичных больных грибовидным микозом, а также у 5 здоровых доноров. Количество миелоидных супрессоров оценивали в моноцитарном гейте как долю (в %) клеток $CD14^+HLA-DR^{low/-}$ среди $CD14^+$ -клеток. Уровень экспрессии гена *PRAME* у больных определяли методом количественной полимеразной цепной реакции в реальном времени. Количественное сравнение проводили по критерию Манна–Уитни.

Результаты и обсуждение. Среднемедианное количество $CD14^+HLA-DR^{low/-}$ у здоровых доноров составляет 5,1 %, у больных грибовидным микозом – 6,0 %, что сопоставимо с показателями здоровых доноров ($p = 0,8576$), у пациентов с множественной миеломой – 51,2 %, что существенно больше, чем у здоровых доноров ($p = 0,0363$). Среднемедианное количество *PRAME*-экспрессирующих клеток у больных множественной миеломой составляло 8,6 %, у пациентов с грибовидным микозом – 2,0 % и у здоровых людей – 0 %. Наблюдалась четкая положительная корреляция между количеством $CD14^+HLA-DR^{low/-}$ -клеток и *PRAME*-экспрессирующих клеток. Мы полагаем, что $CD14^+HLA-DR^{low/-}$ -клетки супрессируют противоопухолевый ответ, что позволяет разрастаться пулу опухолевых *PRAME*-положительных клеток.

Роль Notch во взаимодействии трансформированных и нормальных клеток

В.А. Рыбко, Н.В. Хромова, М.Д. Фармаковская, М.В. Новикова, П.Б. Копнин

ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва

Солидные опухоли человека состоят не только из трансформированных клеток, но и из стромальных элементов, к которым, в частности, относятся и опухоль-ассоциированные фибробласты (ОАФ). ОАФ могут влиять на опухолевую прогрессию, ремоделируя внеклеточный матрикс, секретируя факторы роста и цитокины, а также формируя специфические ниши для опухолевых стволовых клеток. ОАФ по своим характеристикам сходны с нормальными миофибробластами и характеризуются экспрессией α -гладкомышечного актина.

Сигнальный путь Notch активирован во многих опухолях человека. Он стимулирует пролиферацию, дедифференцировку и инвазию клеток. Однако основной акцент в изучении этого каскада сделан на его активацию в трансформированных клетках. Он активируется при непосредственном физическом контакте лиганд- и рецептор-несущих клеток.

В данной работе показано, что активация сигнального каскада Notch в нормальных фибробластах человека необходима для приобретения ими фенотипа миофибробластов. Такие активированные мезенхимальные клетки приобретают способность стимули-

ровать рост подкожных ксенографтов клеток аденокарциномы легкого человека и рака толстой кишки человека у голых мышей, интегрируясь в опухоль и становясь, таким образом, ОАФ.

Мы показали, что взаимодействие неопластических и мезенхимальных клеток активирует в последних сигнальный каскад Notch, что стимулирует продукцию TGF β . Подавление активации рецепторов этого цитокина с помощью химических ингибиторов блокирует образование миофибробластов *in vitro* при совместном культивировании с трансформированными клетками. Более того, активации мезенхимальных клеток не происходит и в фибробластах с подавленной экспрессией p53.

Таким образом, активация Notch в нормальных фибробластах человека при контакте с трансформированными клетками приводит к усилению синтеза TGF β , активируя p53-зависимое формирование фенотипа миофибробластов.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РНФ (соглашение № 14-15-00467).

Диагностический потенциал экзосом, связанных с клетками крови

С.Н. Тамкович^{1,2}, О.С. Тутанов¹, А.Е. Григорьева¹, Н.А. Кирюшина³, В.И. Пермякова⁴, В.Е. Войццкий³, Е.И. Рябчикова^{1,2}, П.П. Лактионов^{1,5}

¹ИХБФМ СО РАН, Новосибирск;

²ФГАОУ ВО «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет»;

³ГБУЗ «Новосибирский областной клинический онкологический диспансер»;

⁴Центральная клиническая больница СО РАН, Новосибирск;

⁵ФГБУ «Новосибирский научно-исследовательский институт патологии кровообращения им. акад. Е.Н. Мешалкина» Минздрава России

Поиск в крови маркеров, характерных для онкотрансформированных клеток, является актуальной задачей молекулярной онкологии. Поскольку в кровотоке онкологических больных циркулируют экзосомы, секретируемые клетками опухолей и содержащие биополимеры, характерные для этих клеток, циркулирующие экзосомы рассматриваются в качестве удобного источника диагностического материала для неинвазивной диагностики/мониторинга злокачественных новообразований. **Целью работы** является оценка диагностического потенциала экзосом, циркулирующих в крови больных раком молочной железы (РМЖ).

Плазму и элюаты с поверхности форменных элементов (ПФЭ) крови клинически здоровых женщин ($n = 10$) и больных РМЖ T1–2N0M0 ($n = 10$) получали, как описано ранее (Tamkovich, 2005). Препараты экзосом из плазмы и элюатов с ПФЭ получали путем последовательной ультрафильтрации и ультрацентрифугирования и характеризовали при помощи

трансмиссионной электронной микроскопии и иммуноокрашивания. Концентрацию белка в экзосомах определяли с помощью NanoOrange Protein Quantitation kit, микроРНК (let-7a, miR-103, miR-191, miR-195, miR-16) — методом количественной полимеразной цепной реакции наборами Invitrogen.

Полученные препараты микрочастиц содержат экзосомы с характерным размером 30–100 нм, экспрессирующие CD9, CD24 и CD63. Впервые установлено, что экзосомы циркулируют не только в плазме, но и будучи связанными с ПФЭ крови. Доля связанных с ПФЭ экзосом составляет 2/3 от их общего числа. Впервые обнаружено, что в крови больных РМЖ наиболее часто выявляются экзосомы диаметром 50–70 нм, в крови здоровых женщин — диаметром 30–50 нм. Показано, что наибольшей диагностической значимостью обладают микроРНК в составе экзосом, связанных с поверхностью эритроцитов: панель let-7a, miR-103 и miR-191 позволяет дискриминировать РМЖ с чувствительностью 71 % и специфичностью 89 %.

Роль нарушений экспрессии транскрипционного фактора HNF4α в прогрессии протоковой аденокарциномы поджелудочной железы человека

М.С. Чесноков¹, Д.А. Шавочкина¹, И.Ф. Кустова¹,
Н.Е. Кудашкин², Ю.И. Патютко², Н.Л. Лазаревич¹

¹Отдел иммунохимии НИИ канцерогенеза ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва;

²отделение опухолей печени и поджелудочной железы НИИ клинической онкологии ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва

Протоковая аденокарцинома поджелудочной железы (ПАКПЖ) отличается чрезвычайно высокой агрессивностью, быстрой прогрессией, ранним метастазированием и устойчивостью к современным методам

терапии. Для разработки новых диагностических и терапевтических подходов необходимы детальные исследования молекулярных механизмов, регулирующих развитие этого типа опухолей.

Транскрипционный фактор HNF4α является одним из важнейших регуляторов дифференцировки поджелудочной железы, печени, кишечника и ряда других органов. В клетках печени, кишечника и почки HNF4α играет роль опухолевого супрессора, однако его функции в клетках ПАКПЖ практически не исследованы. Описаны 2 независимо регулируемые группы изоформ HNF4α (HNF4αP1 и HNF4αP2), отличающиеся трансактивационными свойствами; в норме в клетках поджелудочной железы экспрессируются только изоформы группы HNF4αP2. Мы продемонстрировали, что подавление экспрессии HNF4αP2 в культуре клеток ПАКПЖ CAPAN-2 сопровождается их дедифференцировкой и усилением злокачественного потенциала, что выражается в повышении скорости пролиферации, колониеобразующего и миграционного потенциала.

Исследовав клинические образцы ткани поджелудочной железы 30 пациентов с ПАКПЖ, мы показали, что в 70 % случаев в них наблюдается снижение экспрессии HNF4αP2 по сравнению с прилегающей неопухолевой тканью. В 53 % случаев в ткани ПАКПЖ происходит активация экспрессии нехарактерной для поджелудочной железы группы изоформ HNF4αP1. Изменения экспрессии HNF4α в исследованных образцах коррелируют с изменениями экспрессии важнейших панкреаспецифических генов *PDX1*, *HNF1A*, *HNF1B*, *FOXA2*, *HNF6*.

Таким образом, нарушения экспрессии изоформ HNF4α являются частым событием в ткани ПАКПЖ и выражаются в подавлении экспрессии HNF4αP2 и активации HNF4αP1. Данные, полученные в экспериментах *in vitro* и при исследовании образцов ткани, свидетельствуют о том, что HNF4α является важным регулятором прогрессии ПАКПЖ.

Работа поддержана грантом РФФИ № 13-04-02080.