

СЕКЦИЯ IV

СИГНАЛЬНЫЕ КАСКАДЫ В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ

Доклады

Система инсулиноподобных факторов роста в диагностике, прогнозе и молекулярно-направленной терапии опухолей

Е. С. Герштейн

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

Введение. Сигнальная система инсулиноподобных факторов роста (ИФР), включающая ИФР-I и -II, их трансмембранные рецепторы, а также ИФР-связывающие белки (ИФРСБ) крови, играет важную роль в возникновении и прогрессии различных злокачественных опухолей, поскольку она задействована в качестве ауто-/паракринного регулятора на всех этапах опухолевого процесса.

Задачи исследования. Оценка возможностей использования компонентов сигнальной системы ИФР в качестве мишеней молекулярно-направленной противоопухолевой терапии, а также для диагностики и прогноза течения различных злокачественных опухолей.

Материалы и методы. Анализ данных литературы по базе PubMed (таргетная терапия) и обобщение результатов собственных исследований ИФР и ИФРСБ в сыворотке крови, включающих результаты обследования 455 пациентов с различными опухолями и 94 здоровых доноров.

Результаты. Основным направлением анти-ИФР-терапии является подавление активности рецепторов ИФР с помощью моноклональных антител к внешнему домену или низкомолекулярных ингибиторов их внутренней тирозинкиназы; возможно также снижение уровня циркулирующих ИФР, использование антисмысловых технологий и антидиабетического препарата метформина. К настоящему времени кли-

нические испытания проходили 8 моноклональных антител к рецептору ИФР и 6 ингибиторов тирозинкиназы. Для некоторых из них продемонстрирован значимый эффект в I–II фазе при немелкоклеточном раке легкого, колоректальном раке, метастатическом раке молочной железы, саркоме Юинга и некоторых других онкологических патологиях. В то же время более 50 зарегистрированных программ клинических испытаний выявили значительные проблемы в использовании этих препаратов: одной из важнейших считается отсутствие надежных молекулярных маркеров для предсказания их эффекта и адресного использования. По данным наших исследований, ИФР-I и некоторые ИФРСБ являются значимыми диагностическими и прогностическими маркерами таких заболеваний, как рак яичников, рак толстой кишки, саркомы костей.

Выводы. Противоречивость и неоднозначность результатов исследования роли компонентов сигнальной системы ИФР в патогенезе и клиническом течении опухолей человека отражают сложность взаимоотношений между различными механизмами регуляции нормального роста клеток и канцерогенеза. Однако очевидно, что участие ИФР, их рецепторов и ИФРСБ в процессах опухолевой трансформации, роста и метастазирования делают их перспективными мишенями молекулярно-направленной противоопухолевой терапии, а также биологически значимыми маркерами для прогнозирования течения, диагностики и мониторинга различных онкологических заболеваний.

Роль транскрипционного фактора Brn-3alpha в развитии рака предстательной железы, связь с особенностями гормональной рецепции и уровнем активации АКТ/М-TOR-сигнального пути

А. К. Горбунов¹, Л. В. Спирина^{1,2}, Е. А. Уснини¹,
Е. М. Слонимская^{1,2}, И. В. Кондакова¹

¹НИИ онкологии ФГБНУ «Томский НИМЦ РАН», Томск;

²ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Томск

Введение. Транскрипционные факторы POU — POU4F1, также известные как нейрогенные brain-specific homeobox/POU domain protein 3A (Brn-3alpha), играют важную роль в механизмах гормонального канцерогенеза. Известна их связь с особенностями регуляции андрогеновых (androgen receptor, AR) и эстрогеновых (estrogen receptor, ER) рецепторов, что определяет развитие и прогрессирование рака предстательной железы. Ключевым сигнальным каскадом, обеспечивающим регуляцию процессов пролиферации и апоптоза, является АКТ/м-TOR.

Задачи исследования. Изучение экспрессии транскрипционных факторов Brn-3alpha, AR, ERalpha в процессах развития рака предстательной железы в связи с уровнем активации АКТ/мTOR-сигнального пути.

Материалы и методы. В исследование были включены 30 больных раком предстательной железы. В ткани больных определяли уровень матричной РНК (мРНК) транскрипционных факторов Brn-3alpha, AR, ERalpha, а также компонентов АКТ/м-TOR-сигнального пути: киназу PDK1, АКТ, c-Raf, GSK-3beta, протеинкиназы m-TOR, ингибитора транскрипции 4EBP1, 70-s6 киназу и фосфатазу PTEN.

Результаты. В результате проведенного исследования показано, что инвазивный рост опухоли с прорастанием в капсулу и семенные пузырьки сопровождался ростом экспрессии AR, ERalpha в 2,8 и 6,7 раза соответственно по сравнению с пациентами без инвазии. Данные изменения протекали на фоне активации протеинкиназы АКТ и фосфатазы PTEN, уровень мРНК которых был в 2,2 и 1,7 раза выше у пациентов с наличием признаков прогрессирования заболевания.

Интересным является факт снижения экспрессии транскрипционного фактора Brn-3alpha в 2,1 раза у больных с кастрационно-рефрактерным раком предстательной железы по сравнению с пациентами без данного осложнения. Изменения данного показателя не сопровождалась модификацией уровня AR и ERalpha, однако в этой группе больных выявлено снижение экспрессии ингибитора транскрипции 4EBP1, который является продуктом активации протеинкиназы m-TOR и АКТ.

Выводы. Показано, что транскрипционный фактор Brn-3alpha связан с процессами развития и прогрессирования рака предстательной железы. Его связь с особенностями гормональной рецепции и активации АКТ/м-TOR-сигнального каскада может определять прогноз заболевания.

Рекомбинантный белок теплового шока 70 кДа как стимулятор противоопухолевого иммунитета: от клеточных моделей до доклинических испытаний

И. В. Гужова¹, М. А. Шевцов¹, Е. Ю. Комарова¹,
С. В. Абкин², Б. А. Маргулис¹

¹ФГБНУ «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург;

²ГАОУ ВО ЛО «Ленинградский государственный университет им. А. С. Пушкина», Санкт-Петербург

Введение. Белок теплового шока (heat shock proteins, Hsp70) — существенный компонент микроокружения опухоли, однако его функция вне опухолевой клетки до конца не исследована. Известно, что Hsp70 способен стимулировать противоопухолевый иммунитет — врожденный и адаптивный — в разнообразных моделях рака. Этот эффект обусловлен способностью шаперона проникать в живые опухолевые клетки и выталкивать из них собственный клеточный Hsp70 в микроокружение, и этот бывший клеточный Hsp70 способен запускать цепь событий.

Задачи исследования. Выяснить, каким образом вхождение экзогенного и высвобождение эндогенного Hsp70 может способствовать увеличению чувствительности опухолевых клеток к цитотоксическим лимфоцитам. С использованием модели наиболее злокачественных опухолей — глиобластомы и меланомы — показать терапевтический эффект таргетного введения экзогенного Hsp70.

Материалы и методы. В работе использованы современные методы клеточной биологии и молекулярной иммунологии, хроматографическая очистка Hsp70, методы работы с экспериментальными животными.

Результаты. Мы показали, что при введении экзогенного Hsp70 в культуру опухолевых клеток происходит выход собственного клеточного шаперона, как на поверхность опухолевой клетки, так и в экстраклеточное пространство. Те молекулы, которые задержались на поверхности опухолевой клетки, привлекали клетки врожденного иммунитета, натуральные киллеры, убивающие опухолевые клетки, а тот Hsp70, который выходил в микроокружение, активировал адаптивный иммунный ответ. Внутритропуховое введение чистого Hsp70 имело заметный терапевтический эффект: животные жили дольше, опухоли росли медленнее, происходило заметное увеличение количества CD8⁺ лимфо-

цитов, специфических к клеткам опухоли. Технология внутриопухолевого введения чистого Hsp70 успешно прошла доклинические испытания и в 2011 г. была использована в ограниченном исследовании на пациентах в Институте нейрохирургии им. Поленова. Исследование показало безопасность технологии, ее пригодность и эффективность для пациентов с опухолями мозга.

Выводы. Наше исследование продемонстрировало, что применение очищенного Hsp70 в качестве препарата, стимулирующего противоопухолевый иммунитет, безопасно и перспективно.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант № 14-50-00068).

Молекулярный анализ цитологических препаратов в диагностике узлов щитовидной железы

Н.Н. Колесников^{1,2}, С.Е. Титов¹⁻³, Е.С. Малахина¹,
Т.Л. Полоз⁴, М.К. Иванов^{1,3}, Л.Г. Ахмерова¹,
Ю.А. Веряскина¹, Д.А. Васильева⁵, В.А. Кушнарев⁵,
С.П. Шевченко⁶, А.В. Малек^{5,7}

¹ФГБУН «Институт молекулярной и клеточной биологии
СО РАН», Новосибирск;

²ООО «Мирэль», Новосибирск;

³ЗАО «Вектор-Бест», Новосибирск;

⁴НУЗ «Дорожная клиническая больница на станции
Новосибирск — Главный ОАО «РЖД», Новосибирск;

⁵ФГБУ «НИИ им. Н.Н. Петрова», Санкт-Петербург,
пос. Песочный;

⁶ГБУЗ НО «Городская клиническая больница № 1»,
Новосибирск;

⁷ООО «Онкосистема», Санкт-Петербург

Проблема. Узловые патологии щитовидной железы затрагивают 20–40 % населения России. Основной метод диагностики — тонкоигольная аспирационная биопсия под контролем ультразвукового наведения с последующим цитологическим анализом. В 30 % возникают случаи неопределенности дооперационной диагностики.

Решение. Предлагается уникальная для России технология молекулярно-генетического анализа (МГА) с уже имеющихся цитологических препаратов (с заключением врача). Молекулярно-генетический анализ дает дополнительную количественную и качественную информацию о характере новообразований щитовидной железы, что позволит избежать неоправданных операций на доброкачественных узлах, или наоборот, установить злокачественность и, таким образом, повысить точность дооперационной диагностики, выбрать правильную тактику дальнейшего лечения. Создан прототип тест-системы Тироид-Инфо на основе анализа более 800 цитологических препаратов и более 200 образцов операционного материала.

Результаты. В материале цитологических препаратов высокий уровень экспрессии микроРНК miR-146b и -221 позволяет дискриминировать доброкачественные и злокачественные узловые новообразования и в основном ассоциирован с классическим вариантом папиллярной карциномы. Наличие мутации *BRAF V600E* в исследованном материале увеличивает точность диагностической классификации папиллярной карциномы до 100 %. Кроме этого, Американская ассоциация по щитовидной железе в 2015 г. рекомендовала проводить генетическое исследование на наличие этой мутации для всех случаев папиллярной карциномы, так как это определяет более агрессивный курс лечения. miR-375 является классификатором медуллярной карциномы как на цитологических препаратах, так и на операционном материале. Анализ случаев неопределенной диагностики категории III ($n = 15$) и категории IV, фолликулярные неоплазии ($n = 156$) (Bethesda, 2010) позволил соответственно в 20 и 32 % случаев выявить злокачественные образования, включая наличие 12 мутаций по гену *BRAF V600E*. Также были выявлены 15 признаков злокачественности в 392 образцах, классифицированных как доброкачественные образования. В разработанном комбинированном алгоритме теста Тироид-Инфо специфичность и чувствительность для категорий III и IV (Bethesda) составили 77 и 98 % соответственно, предсказательная ценность отрицательного результата — 97 %, предсказательная ценность положительного результата — 89 %.

Выводы. Предложен алгоритм молекулярного тестирования (Тироид-Инфо) цитологических препаратов из узловых новообразований щитовидной железы, основанный на количественных оценках микроРНК и выявлении мутации V600E в гене *BRAF V600E*. Этот алгоритм может быть положен в основу диагностического решения, не замещающего цитологический анализ, но позволяющего уточнить его результаты и исключить грубые ошибки. Молекулярно-генетический анализ должен стать важной частью молекулярной цитологии и клинической онкологии в ближайшем будущем.

*Работа поддержана грантами
по Программе фундаментальных исследований
Президиума РАН «Фундаментальные исследования
для разработки биомедицинских технологий»
ФИМТ-2014-094 и «Фундаментальные науки
медицине» ФНМ-08.*

Ингибиторы молекулярных шаперонов усиливают эффект традиционных противоопухолевых лекарств в клеточных и животных моделях рака

Б.А. Маргулис, В.Ф. Лазарев, Д.В. Сверчинский,
Е.С. Чухно, И.В. Гужова

ФГБУН «Институт цитологии РАН»,
Санкт-Петербург

Введение. Одним из свойств шаперона белка теплового шока 70 (БТШ70) является защита раковых клеток от действия противоопухолевых средств. Поэтому для повышения эффективности традиционных препаратов имеет смысл применять их в комбинации с ингибиторами БТШ70. Шаперонный цикл включает захват поврежденного белка молекулой БТШ70 и придание субстрату активной формы. Эти реакции стали основой для разработки специальных тест-систем. Выявленное в процессе тестирования соединение показало свою противоопухолевую активность в сочетании с известным препаратом доксорубицин.

Задачи исследования. Сконструировать тест-системы для поиска ингибиторов шаперона БТШ70, проанализировать библиотеку малых молекул и определить активность выявленных соединений в клеточных и животных моделях рака.

Материалы и методы. Для поиска ингибиторов БТШ70 были разработаны 2 системы скрининга и использовалась библиотека компании InterBioScreen. Одна из систем основана на узнавании денатуриро-

ванного белка очищенным БТШ70; узнавание снижается, если в смеси с БТШ70 присутствует ингибитор. Другая система (рефолдинг-тест) основана на способности БТШ70 восстанавливать активность денатурированной люциферазы; ингибитор должен снижать скорость восстановления фермента. Эффекты выбранных веществ, в монорежиме и в комбинации с доксорубицином на клетки глиомы крысы С6 и меланомы мыши В16 оценивали с помощью методов окраски МТТ, акридиновым оранжевым, технологий CytoTox96 и xCELLigence.

Результаты. В ходе тестирования субстратсвязывающей и рефолдинг-активности БТШ70 выявлено активное вещество АЕАС, производное колхицина. Далее мы показали, что АЕАС способен проходить в живые раковые клетки и подавлять в них оба вида шаперонной активности БТШ70. В экспериментах с клетками меланомы мыши В16 и глиомы крысы С6 установлено, что АЕАС нетоксичен и увеличивает эффект доксорубицина как в плане подавления роста клеток, так и индукции апоптоза. Усиление противоопухолевого действия доксорубицина было продемонстрировано на животных, получавших АЕАС: рост опухоли замедлялся и срок гибели отдалялся на 10–15 дней.

Выводы. Нами впервые разработаны и применены тест-системы для анализа ингибиторов шаперона БТШ70. Найдено вещество, подавляющее шаперонную активность БТШ70 в клетках меланомы мыши и глиомы крысы. Это вещество, производное колхицина, усиливало действие доксорубицина на клетки указанных линий, а также в животных моделях рака.

*Работа выполнена
при финансовой поддержке РФФ
(грант № 14-50-00068).*

Постеры

Паттерны экспрессии внутриклеточных сигнальных молекул как инструмент дифференциальной диагностики CD5+ В-клеточных лимфом

Д.М. Поташникова, А.А. Гладких, И.А. Воробьев

Биологический факультет
ФГБОУ ВО «МГУ им. М.В. Ломоносова», Москва

Введение. Субклассификация В-клеточных лимфом — незаконченный процесс, требующий детальных исследований молекулярных паттернов экспрессии, характерных для В-лимфоцитов. На сегодняшний день по морфологии, иммунофенотипу В-клеток и данным об экспрессии ряда внутриклеточных сигнальных эффекторов можно достоверно разделить В-клеточный хронический лимфолейкоз (В-ХЛЛ) и лимфому из клеток мантийной зоны (ЛКМЗ), несмотря на их схожесть, в частности на наличие поверхностного маркера CD5. Однако ряд вопросов сохраняется из-за существования промежуточных форм между ними. В гематоонкологии группы таких промежуточных форм между 2 нозологиями объединяются относительно новым термином «серая зона».

В настоящей работе группа лимфом «серой зоны» между В-ХЛЛ и ЛКМЗ, выделенная в соответствии с современными критериями Всемирной организации здравоохранения, сравнивается с «классическими» вариантами этих нозологий. Критериями сравнения являются уровни экспрессии матричных РНК (мРНК) передающих и эффекторных сигнальных белков каскада В-клеточного рецептора, по которым разделение «классических» В-ХЛЛ и ЛКМЗ не вызывает сложностей: CD79A, CD79B, SYK, LYN, ZAP70, CCND1.

Задачи исследования. Достоверное разделение различных вариантов CD5+ В-клеточных лимфом по профилям экспрессии мРНК сигнальных белков сигнального каскада от В-клеточного рецептора.

Материалы и методы. Подробный иммунофенотип В-клеточных лимфом был описан методом многоцветной проточной цитофлуориметрии (FACS). Из исследованных проб была выделена РНК, транскрибирована комплементарная ДНК и проведена полимеразная цепная реакция в реальном времени с использованием SYBR Green I.

Результаты. В выборке «классических» В-ХЛЛ наблюдается характерное разделение на 2 подгруппы по уровню мРНК гена ZAP70 (подгруппы ZAP70high и ZAP70low с собственным профилем экспрессии

мРНК), не распространяющееся на группы ЛКМЗ и лимфом «серой зоны». В выборке лимфом «серой зоны» разброс значений относительных нормализованных уровней экспрессии исследованных мРНК сопоставим с разбросом в группе ЛКМЗ. При этом группы достоверно отличаются по уровням экспрессии мРНК SHP1 (медианы 7,80 в группе ЛКМЗ против 1,73 в группе «серой зоны») и CD79A (медианы 0,67 в группе ЛКМЗ против 0,93 в группе «серой зоны»).

Выводы. На основании транскрипционного профиля сигнальных молекул возможна субклассификация CD5+ В-клеточных лимфом человека. Полученные данные могут свидетельствовать о разном функциональном состоянии В-клеточного рецептора и его сигнального каскада в описанных нозологиях и использоваться как в дифференциальной диагностике, так и при выборе потенциальных терапевтических мишеней.

Механизм развития резистентности к метформину в клетках рака молочной железы: экзосомы и горизонтальный путь передачи резистентности

С.Е. Семина, М.А. Красильников

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

Введение. Метформин — антидиабетический препарат из группы бигуанидов, применяющийся для лечения диабета 2-го типа. Целый ряд исследований показал, что этот препарат существенно снижает риск развития онкологических заболеваний и проявляет высокую противоопухолевую активность.

Задачи исследования. Изучение чувствительности клеток MCF-7 к антипролиферативному действию метформина и исследование механизма развития резистентности к метформину при длительном его воздействии на клетки.

Материалы и методы. Проводили иммуноблоттинг, репортерный анализ, МТТ-тест.

Результаты. Мы показали, что добавление метформина к клеткам MCF-7 приводит к выраженному торможению роста клеток, которое сопровождается подавлением активности рецептора эстрогенов α (estrogen receptor α , ER α). С учетом способности метформина подавлять активность ER — мы изучили влияние длительного воздействия препарата на рост и гормональную зависимость клеток MCF-7. Как оказалось, полученная

после длительного культивирования с метформином линия клеток MCF-7/M приобрела относительную устойчивость к антипролиферативному действию метформина и одновременно к действию тамоксифена. Проведенный анализ содержания и транскрипционной активности ER α продемонстрировал существенное снижение этих показателей в клетках MCF-7/M по сравнению с клетками MCF-7. Далее была изучена возможность горизонтального пути развития резистентности к метформину при совместном культивировании резистентных и родительских клеток. Для этого была выведена стабильная GFP-продуцирующая резистентная сублиния MCF-7/M GFP, что позволяло отличить эти клетки от родительских при их совместном культивировании. Мы обнаружили, что кокультивирование этих 2 линий приводит к развитию частичной резистентности к метформину у клеток MCF-7.

Из родительских клеток MCF-7 и резистентных MCF-7/M мы получили препараты экзосом и проанализировали их влияние на чувствительность клеток MCF-7 к метформину. Оказалось, что регулярное добавление к клеткам MCF-7 экзосом, полученных от резистентных клеток MCF-7/M, приводит к развитию частичной резистентности клеток MCF-7 к метформину.

Выводы. Впервые на экспериментальных моделях показано, что кокультивирование чувствительных и метформин-резистентных клеток рака молочной железы приводит к развитию резистентности к метформину родительских клеток. Решающим фактором в подобном пути передачи устойчивости являются межклеточные взаимодействия, реализуемые также с участием экзосом резистентных клеток.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 16-34-01031).

Тезисы

Роль серин-треониновой протеинкиназы PAK1 в поддержании автономного роста и выживаемости клеток рака молочной железы

В.А. Шатская, О.Е. Андреева

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

Введение. На сегодняшний день основным критерием определения чувствительности к гормональным противоопухолевым препаратам является содержание рецепторов эстрогенов (estrogen receptor, ER). Однако гормональная резистентность может развиваться и при сохранении ER в результате дисбаланса белков-регуляторов, лиганд-независимой активации ER, стимуляции сигнальных путей, независимых от ER. Цель работы — изучение роли серин-треониновой протеинкиназы PAK1 (p21-activated kinase 1) в развитии и поддержании эстроген-независимого роста клеток рака молочной железы.

Задачи исследования. Исследование молекулярного механизма протективного и ростстимулирующего действия PAK1 в клетках рака молочной железы.

Материалы и методы. Проводили иммуноблоттинг, репортерный анализ, МТТ-тест.

Результаты. Продемонстрировано участие серин-треониновой протеинкиназы PAK1 в поддержании эстроген-независимого роста опухолевых клеток. Мы установили, что подобные митогенные эффекты PAK1 ассоциированы со стимуляцией ключевых сигнальных путей опухолевой клетки: MAPK/AP-1-каскада, WNT- β -катенинового пути, Snail1-сигнального пути. Показано, что для реализации действия PAK1 ключевым фактором является фосфорилирование α -Pix, коактиватора PAK1, по серину в положении 488. Продемонстрировано значение PAK1-сигнальной системы в регуляции выживаемости опухолевых клеток, в том числе в условиях гипоксии. В целом полученные результаты свидетельствуют о перспективности использования PAK1 в качестве маркера развития гормональной резистентности рака молочной железы и потенциально-го объекта таргетной терапии опухолей молочной железы.

Выводы. PAK1 является одним из факторов, необходимых для поддержания роста клеток рака молочной железы, в большей степени — для роста эстроген-независимых опухолей молочной железы. Митогенный эффект PAK1 ассоциирован со стимуляцией ключевых сигнальных путей опухолевой клетки и может быть реализован без участия гормонального сигналинга.

*Работа выполнена
при финансовой поддержке РФФИ
(грант № 14-04-00023).*