

на правах рукописи

СЕНОТОВ АНАТОЛИЙ СЕРГЕЕВИЧ

**ПОВЫШЕНИЕ РЕЗИСТЕНТНОСТИ
КЛЕТОК ОСТРОГО МИЕЛОДНОГО ЛЕЙКОЗА
К TRAIL-ИНДУЦИРОВАННОМУ АПОПТОЗУ
В ТРЕХМЕРНЫХ КУЛЬТУРАХ ВЫСОКОЙ ПЛОТНОСТИ**

Специальность
1.5.22. – Клеточная биология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Пушино 2023

Работа выполнена на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук, г. Пущино.

**Научные
руководитель:** кандидат биологических наук
Фадеев Роман Сергеевич

**Официальные
оппоненты:** **Коваль Ольга Александровна**, доктор биологических наук, ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, лаборатория биотехнологии, ведущий научный сотрудник (г. Новосибирск).

Яголович Анна Валерьевна, кандидат биологических наук, ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, лаборатория инженерии белка, научный сотрудник (г. Москва).

**Ведущая
организация:** ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (г. Москва)

Защита диссертации состоится «___» декабря 2023 г. в ___ часов на заседании Диссертационного совета 24.1.232.01 по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр “Пущинский научный центр биологических исследований Российской академии наук” Институт биофизики клетки наук по адресу: 142290, Московская область, г. Пущино, ул. Институтская, д. 3.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной библиотеке ФИЦ ПНЦ РАН по адресу: 142290, Московская область, г. Пущино, ул. Институтская, д. 3 и на сайте <https://www.pbcras.ru>

Автореферат разослан «___» _____ 20__

Ученый секретарь
диссертационного совета,
д.б.н.



Дегтярева Ольга Васильевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Острые миелоидные лейкозы (ОМЛ) занимают второе место в структуре онкологических заболеваний и составляют 25% из всех злокачественных новообразований у детей, причем 15-30% пациентов не достигают ремиссии после химиотерапии и, более чем у 60% пациентов в течение первых трех лет развивается рецидив (Клинические рекомендации ОМЛ, 2020). Таким образом, для ОМЛ характерна низкая эффективность терапии, которую связывают с формированием лекарственной устойчивости. Лекарственную устойчивость ОМЛ можно разделить на 2 типа: первичную, опосредующую низкую эффективность первого курса терапии, и вторичную, возникающую уже при повторных курсах (Zhang et al., 2019). Наибольший интерес, с точки зрения формирования первичной устойчивости, представляют условия микроокружения клеток ОМЛ, прежде всего в костном мозге (КМ) (Behrmann et al., 2018, Maman, Witz, 2018). Условия микроокружения клеток ОМЛ обусловлены как компонентами стромы КМ – мезенхимными клетками и внеклеточным матриксом, так и собственно лейкозными клетками (De Looff, De Jong, Kruijt, 2019). Накопление лейкозных клеток в ограниченном пространстве КМ способствует образованию уникального окооклеточного микроокружения, обеспечивающего повышение устойчивости к клеточной гибели (Li et al., 2019; Binder, Luciano, Norejs-Hoeck, 2018). Таким образом, изучение устойчивости клеток ОМЛ к индукции гибели в условиях их накопления в ограниченном пространстве может приблизить нас к пониманию критических механизмов глобальной лекарственной устойчивости ОМЛ. При этом, интерес вызывает повышение не только лекарственной устойчивости, но и резистентности клеток ОМЛ к действию медиаторов противоопухолевого иммунитета.

Цитокин TRAIL (TNF alpha Related Apoptosis Inducing Ligand) – мембранно-связанный белок семейства ФНО, представленный на внешней клеточной мембране цитотоксических Т-клеток, НК-клеток и миелоидных дендритных клеток. Данный белок является одним из главных молекулярных эффекторов противоопухолевого иммунитета и индуцирует селективный рецептор-опосредованный апоптоз трансформированных клеток, связываясь с мембранными рецепторами DR4 и DR5 (Alizadeh Zeinabad, Szegezdi, 2022). Однако оказалось, что уже в условиях *in vitro* клетки солидных опухолей (карцином, сарком и т.д.) приобретают TRAIL-резистентность в условиях накопления клеток в ограниченном пространстве, в двумерных (конфлюентные культуры) и трехмерных (клеточные сфероиды) многоклеточных структурах (Yokokura et al., 2016;

Grayson et al., 2021). В литературе отсутствуют данные о возможности повышения TRAIL-резистентности у клеток ОМЛ в схожих условиях. С учетом того, что клетки ОМЛ не зависят от прикрепления и культивируются в суспензии, в отличие от клеток солидных опухолей, нами была предложена простая трехмерная *in vitro* модель, имитирующая накопление лейкозных клеток в ограниченном пространстве КМ – стационарные высокоплотные культуры, культивируемые без смены питательной среды. В данной модели впервые показана принципиальная возможность повышения устойчивости клеток ОМЛ как к действию химиотерапевтических препаратов, так и к цитотоксическому действию rhTRAIL (Фадеев и др., 2015).

В работе представлены результаты исследования механизмов повышения резистентности клеток ОМЛ к TRAIL-индуцированному апоптозу в трехмерных высокоплотных культурах, имитирующих накопление лейкозных клеток в пространстве костного мозга.

Целью работы является изучение резистентности клеток ОМЛ к TRAIL-индуцированному апоптозу в трехмерных культурах высокой плотности *in vitro*.

В соответствии с целью были поставлены **следующие задачи**:

1. Исследование изменения резистентности клеток ОМЛ к TRAIL-индуцированному апоптозу в трехмерных культурах высокой плотности.
2. Исследование механизмов повышения резистентности клеток ОМЛ к TRAIL-индуцированному апоптозу в трехмерных культурах высокой плотности.
3. Оценка возможности подавления повышенной резистентности клеток ОМЛ к TRAIL-индуцированному апоптозу в трехмерных культурах высокой плотности.

Новизна работы. В работе впервые показано возникновение резистентности клеток ОМЛ к TRAIL – индуцированному апоптозу в трехмерных культурах высокой плотности. Этот феномен обратим и не связан с ограничением проникновения белка TRAIL к клеткам. Впервые установлено, что повышение TRAIL-резистентности клеток ОМЛ в трехмерных культурах высокой плотности основано на TNF-регулируемом и NF- κ B опосредованном увеличении экспрессии антиапоптотических белков семейств IAP и BCL-2. Показана принципиальная возможность подавления резистентности клеток ОМЛ к TRAIL – индуцированному апоптозу в трехмерных культурах высокой плотности с помощью ВНЗ миметика Navitoclax.

Теоретическая и практическая значимость работы. Показана возможность подавления резистентности клеток ОМЛ к TRAIL-индуцированному апоптозу в трехмерных культурах высокой плотности,

при использовании ВНЗ миметика Navitoclax. Данные результаты имеют значение для разработки новых подходов в иммунотерапии ОМЛ.

Методология и методы исследования. Методологической основой диссертационного исследования выступают методы аналогии и моделирования, используемые для научного познания процессов и явлений, происходящих в организме человека.

Для решения поставленных задач и достижения цели исследования в ходе работы были использованы методы биофизики и клеточной биологии, такие как проточная цитометрия, спектрофото- и флуорометрия, вестерн-блоттинг, секвенирование РНК, методы биоинформатического анализа. Работа выполнена с использованием постоянных клеточных линий острого миелоидного лейкоза человека, культивируемых в культурах высокой плотности, что позволяет создать предметную (материальную) модель паталогического состояния лейкозных бластов в костном мозге.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. У клеток ОМЛ в трехмерных культурах высокой плотности происходит повышение резистентности к TRAIL-индуцированному апоптозу.

2. Повышение TRAIL-резистентности клеток ОМЛ в трехмерных высокоплотных культурах является обратимым и не связано с ограничением проникновения цитотоксического белка к клеткам.

3. Повышение TRAIL-резистентности клеток ОМЛ в трехмерных высокоплотных культурах регулируется TNF-NF- κ B зависимым повышением экспрессии антиапоптотических белков семейств IAP и BCL-2.

4. Резистентность клеток ОМЛ к TRAIL- индуцированному апоптозу в трехмерных высокоплотных культурах эффективно подавляется применением ВНЗ миметика Navitoclax.

Достоверность полученных результатов. Достоверность полученных результатов обеспечена репрезентативным количеством материала, глубокой проработкой темы и методов исследования. Эксперименты проводились на современном сертифицированном оборудовании. Обработка данных и подтверждение достоверности полученных результатов проводилась с использованием современных статистических методов и программ. Полученные в ходе работы результаты соответствуют данным, представленным в научной литературе, и соответственно интерпретируются.

Апробация. Основные материалы диссертационной работы доложены на V Всероссийской Конференции по молекулярной онкологии (Москва, Россия, 16-18 декабря 2019 года), 19-й Международной Пуцинской школе-конференции молодых ученых «Биология - наука XXI

века» (Пушино, Россия, 20-24 апреля 2015 г.), Abs. European Leukemia Net (ELN) Frontiers Meeting (Berlin, Germany, 16-19 October 2014), EMBO Workshop «Cellular and molecular mechanism of tumour–microenvironment crosstalk» (Toms, Russia, 9-12 July 2015), 1-й Международной конференции для молодых ученых «Mitochondrial pores and channels as pharmacological targets» (Пушино, Россия, 29-30 октября 2014 г.).

Личный вклад автора. Диссертационная работа выполнена автором лично. Постановка научной проблемы и формулировка рабочей гипотезы, планирование эксперимента, анализ и интерпретация полученных результатов осуществлялись совместно с научными руководителями. Поиск и анализ литературы по теме диссертации, экспериментальные исследования и статистическая обработка первичных данных, написание и оформление диссертации выполнено автором самостоятельно. Результаты исследования в виде публикаций в научных периодических изданиях и докладов на конференциях представлены совместно с соавторами.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 20 печатных работ, в том числе 5 статей в журналах, рекомендованных ВАК РФ.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 132 страницах, содержит 26 рисунков и 3 таблицы. Список цитируемой литературы включает 296 источников.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клеточные культуры и условия культивирования

В работе использовали клетки ОМЛ человека HL-60, MV4-11 и THP-1 полученные из ATCC (США), а также клетки K562, KG-1 и U937 полученные из Всероссийской коллекции клеточных культур (ИНЦ РАН, Санкт-Петербург). Клетки культивировали в среде RPMI-1640 (Sigma, США) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Gibco, США) и 40 мкг/мл гентамицина сульфата.

Рекомбинантный белок izTRAIL

Рекомбинантный человеческий белок TRAIL, содержащий последовательность изолейцинового зиппера (izTRAIL), получен в соответствии с методикой (Fadeev et al., 2019) и предоставлен А.В. Чекановым.

Оценка жизнеспособности клеток

Жизнеспособность клеток после инкубации с izTRAIL оценивали по интенсивности восстановления резазурина (Sigma, США) с

использованием планшетного спектрофлуориметра Infinite F200 (Tecan, Австрия).

Проточная цитометрия

Поверхностную экспрессию TRAIL-рецепторов (DR4, DR5, DcR1 и DcR2), содержание белков Bcl-2 и cPARP(Asp214) определяли с использованием соответствующих моноклональных антител, с помощью проточного цитометра Accuri C6 (BD Bioscience, США).

Вестерн-блот анализ

Электрофорез в денатурирующих условиях выполняли по методу Лэммли (Jung N. et al., 2019) с последующим переносом белков на нитроцеллюлозную мембрану 0,2 мкм (Bio-Rad, США). Белки FADD, cFLIP, каспаза-8 и Bid идентифицировали соответствующими моноклональными антителами. В качестве контроля белковой нагрузки использовали GAPDH (Cell Signaling, США). Количественный анализ интенсивности белковых полос проводили с помощью денситометрии, с использованием программного обеспечения Image Lab (Bio Rad, США).

Секвенирование транскриптомов клеток

Секвенирование РНК проводили в Лаборатории исследований генома ИТЭБ РАН (рук. Ермаков А. М.), методом нанопорового секвенирования, с использованием секвенатора MinION и ячейки SpotON Flow Cell (R9.4) Single (Oxford Nanopore Technologies).

Анализ дифференциальной экспрессии генов

Анализ дифференциальной экспрессии генов включал анализ обогащения наборов генов из базы данных молекулярных сигнатур MSigDB коллекций Hallmark и TFT с использованием программного пакета для языка программирования Python GSEapy, анализ функциональной представленности генов с наибольшими изменениями экспрессии проводился по базам данных GeneOntology и KEGG, анализ белок-белковых взаимодействий производился с использованием программного обеспечения Cytoscape (ver. 3.10.0).

Анализ ферментативной активности каспаз 3/7

Анализ активности эффекторных каспаз 3/7 исследовали с использованием набора Caspase-3 Activity Assay Kit (Cell Signaling Technology, США), на приборе Infinite F200 (Tecan, Австрия), согласно инструкции производителя.

Количественная ПЦР с обратной транскрипцией

Выделение тотальной РНК осуществляли с использованием набора innuPREP RNA Mini Kit 2.0 (Analytik Jena, Германия). Синтез и амплификацию кДНК проводили с использованием набора OneTube RT-PCR SYBR (Евроген, Россия) на приборе QuantStudio 5 Real-Time PCR (Thermo Scientific, США), согласно инструкции производителя.

Статистический анализ

Результаты представляли в виде среднего $\pm$ стандартное отклонение ($M \pm SD$). Опыты проводили не менее чем в пяти повторах ($n \geq 5$). Статистическую значимость отличия определяли с помощью одностороннего ANOVA с последующим множественным сравнением Холма-Сидака, $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Повышение резистентности клеток ОМЛ к TRAIL-индуцированному апоптозу в трехмерных культурах высокой плотности

Нами была предложена *in vitro* модель, отражающая накопление лейкозных клеток в ограниченном пространстве костного мозга. Для этого клетки ОМЛ ТНР-1, высевали по 5×10^3 клеток в 100 мкл питательной среды в лунки U-образного культурального планшета. Через 24 часа культивирования количество клеток увеличивалось до 1×10^4 в лунке, и мы использовали их как культуры низкой плотности (НПК). Через 120 часов культивирования без смены питательной среды количество клеток увеличивалось до 1×10^5 в лунке, формируя трехмерную многоклеточную структуру - высокоплотную культуру клеток ОМЛ (ВПК) (рис. 1). Через 120 ч. клеточная культура находилась в стадии экспоненциального роста и число погибших клеток не превышало $1,8 \pm 0,4\%$ (рис. 1г, д). При этом в несколько раз возрастали объем и занимаемая площадь.

Было показано, что через 24 часа после посева (НПК) $16 \pm 4\%$ клеток были устойчивы к действию *iz*TRAIL вплоть до концентрации $1,5$ мкг/мл, через 72 часа количество резистентных клеток увеличилось до $50 \pm 4\%$. Через 120 часов от посева (ВПК) в культуре $74 \pm 2\%$ клеток становилось резистентными к действию *iz*TRAIL (рис. 2а). Дополнительно, был показан схожий эффект повышения резистентности к TRAIL-индуцированному апоптозу в трехмерных высокоплотных культурах для клеток ОМЛ HL-60, MV-4-11 и U-937 (в автореферате данные не представлены).

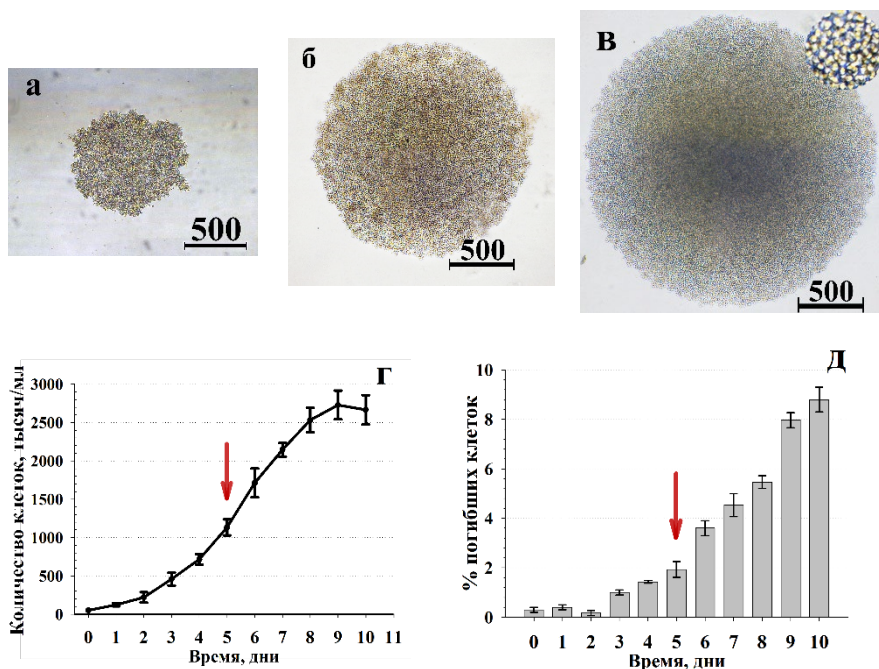


Рисунок 1. Микрофотографии культур клеток ТНР-1 через 24 (НПК) (а), 72 часа (б) и 120 (ВПК) (в) часов. График роста клеточной культуры ТНР-1 (г), количество мертвых клеток в процентах (д). Стрелкой отмечены культуры используемые как ВПК.

Далее мы показали, что резистентность клеток ОМЛ в ВПК имеет обратимый характер. Для этого переносили клетки из ВПК в новые U-образные 96-луночные планшеты, в концентрации 5×10^3 клеток в лунку и культивировали 24 часа, после чего добавляли *iz*TRAIL и культивировали еще 1 сутки (на графике НПК восст.). При переносе резистентных клеток ТНР-1 из ВПК, в НПК, происходило восстановление чувствительности клеток к TRAIL-индуцированному апоптозу (рис. 26).

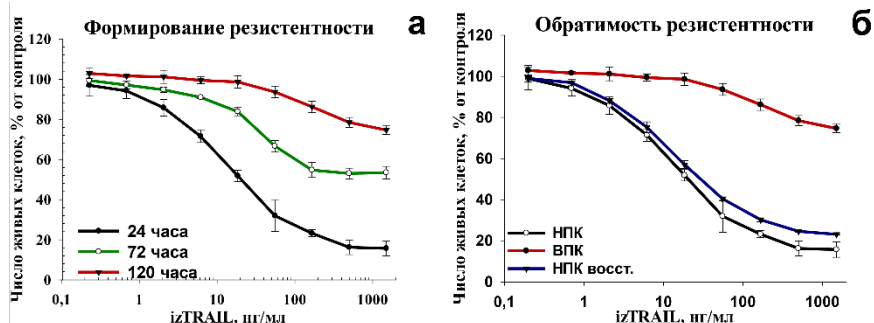


Рисунок 2. Цитотоксическое действие izTRAIL на клетки линии THP-1 через 24 (НПК), 72 и 120 (ВПК) часов после посева по 5 тыс. клеток в планшеты с U-образным дном (а). Обратимость устойчивости культуры клеток THP-1 (б). Данные приведены в виде среднего значения $\pm$ SD ($n \geq 10$).

Далее, была определена зависимость TRAIL-резистентности клеток ОМЛ в ВПК от концентрации клеток и, собственно, трехмерной структуры ВПК. Для определения зависимости TRAIL-резистентности от концентрации клеток в ВПК, клетки THP-1 высаживали в лунки U-образного 96-луночного планшета, в концентрации 1×10^5 клеток в 100 мкл питательной среды в лунку, что соответствует ВПК, и немедленно к клеткам добавляли белок izTRAIL (на графике 1×10^6 кл/мл). В данных условиях наблюдали повышение резистентности клеток ОМЛ THP-1 к TRAIL-индуцированной гибели, но гораздо менее выраженное, чем в условиях ВПК (рис. 3а).

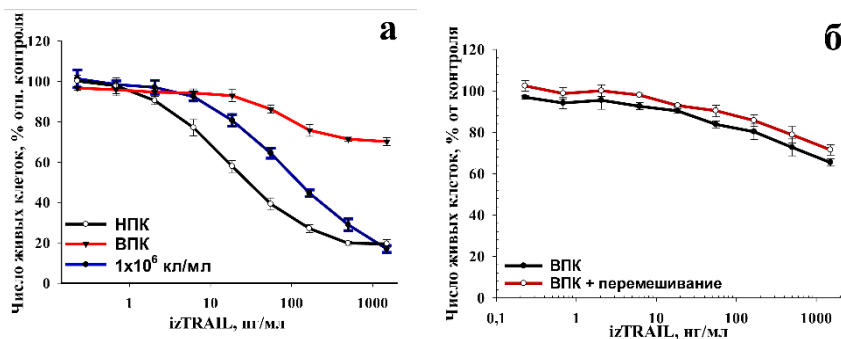


Рисунок 3. Исследование зависимости TRAIL-резистентности клеток ОМЛ в высокоплотной культуре (ВПК) от концентрации клеток (а) и трехмерной структуры ВПК (б). Данные приведены в виде среднего значения $\pm$ SD ($n \geq 10$).

Хорошо известно, что трехмерная структура во многом определяет доступ цитотоксических агентов в многоклеточных культурах клеток, например, в случае многоклеточных сфероидов (Grayson et al., 2021). Для определения зависимости TRAIL-резистентности от трехмерной структуры ВПК, клетки ТНР-1 в ВПК аккуратно ресуспендировали, добавляли к суспензии клеток izTRAIL и культивировали еще 1 сутки (ВПК+перемешивание). Перемешивание разрушало трехмерную структуру ВПК, но не изменяло резистентность клеток ТНР-1 к TRAIL-индуцированному апоптозу, по сравнению с недиссоциированной ВПК (рис. 136).

Таким образом, полученные результаты показывают возможность повышения резистентности клеток ОМЛ к TRAIL-индуцированному апоптозу в ВПК. Повышение TRAIL-резистентности у клеток ОМЛ в ВПК является обратимым, не связано, с непосредственным повышением количества клеток в культуре, а также не зависит от трехмерной структуры ВПК.

2. Биоинформатический анализ транскриптома клеток ОМЛ ТНР-1 в трехмерных культурах высокой плотности

Для выяснения механизмов повышения TRAIL-резистентности у клеток ОМЛ в высокоплотных культурах было выполнено секвенирование транскриптома клеток ТНР-1 в ВПК в сравнении с НПК. Всего обнаружено 15 тыс. транскрибируемых генов, из которых отобраны достоверно дифференциально экспрессируемые гены (ДЭГ) с поправкой на множественное тестирование Беньямини-Хохберга ($FDR \leq 0,05$) (Benjamini, Hochberg 1995) с кратностью изменения (КИ): $-1 \leq \text{Log}_2(\text{КИ}) \leq 1$. Заданным параметрам соответствовали 121 ДЭГ, из которых 92 гена обладали повышенной экспрессией и 29 генов пониженной экспрессией. Далее эти гены были проанализированы с помощью базы данных «Генная онтология» (Gene Ontology, GO) (Thomas et al., 2022), по трем словарям - биологические процессы (Biological Processes, GO:BP), молекулярные функции (Molecular Functions, GO:MF), клеточные компоненты (Cellular Components, GO:CC), а также с помощью интернет ресурса «Киотская энциклопедия генов и геномов» (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) (Kanehisa 2000), по базе данных KEGG PATHWAY. Было показано, что по словарю GO:BP ДЭГ с повышенной транскрипционной активностью были ассоциированы с позитивной регуляцией хронического воспалительного ответа (GO:0002676), фосфорилированием IkB (GO:1903721) и синтезом полиненасыщенных жирных кислот (GO:0006636), по словарю GO:MF – с активностью ацил-КоА-десатураз (GO:0016215) и стероил-КоА-десатураз (GO:0004768), а по словарю

GO:CC – с третичными (GO:0070820) и специфическими гранулами (GO:0035579). Далее, при анализе ДЭГ с повышенной транскрипционной активностью с помощью базы данных KEGG PATHWAY было выявлена их ассоциация с биосинтезом полиненасыщенных жирных кислот (KEGG:01040) и метаболизмом холестерина (KEGG:04979) (рис. 4). Исходя из вышесказанного, ДЭГ с повышенной транскрипционной активностью, в основном ассоциированы с активацией провоспалительных сигнальных путей и ферментов, а также с синтезом полиненасыщенных жирных кислот, являющихся предшественниками медиаторов воспаления, таких как эйкозаноиды (Calder 2020).



Рисунок 4. Функциональная аннотация ДЭГ с повышенной транскрипционной активностью у клеток ТНР-1 в ВПК по словарям баз данных «Генная онтология» (GO) и KEGG PATHWAY. Словарь биологические процессы (GO:BP), словарь клеточные компоненты (GO:CC), словарь молекулярные функции (GO:MF). * - $FDR \leq 0,05$; ** - $FDR \leq 0,01$.

Далее было показано, что по словарю GO:BP ДЭГ с пониженной транскрипционной активностью были ассоциированы с трансмембранным транспортом ионов цинка (GO:0071582), по словарю GO:MF – с активностью рецепторов галанина (GO:0031763) и связыванием лептомицина В (GO:1901707), а по словарю GO:CC – с транспортом

аминокислот (GO:1990184) и везикул комплекса Гольджи (GO:0070319). При анализе ДЭГ с пониженной транскрипционной активностью с помощью базы данных KEGG PATHWAY было выявлена ассоциация с транспортом неорганических ионов (KEGG:04978) (рис. 5). То есть, ДЭГ с пониженной транскрипционной активностью, в основном ассоциированы с развитием противовоспалительного ответа, известными активаторами которого являются ионы цинка и лептомицин В (Jarosz et al., 2017; Downton et al., 2023).



Рисунок 5. Функциональная аннотация ДЭГ с пониженной транскрипционной активностью у клеток THP-1 в ВПК по словарям базы данных «Генная онтология» (GO) и KEGG PATHWAY. Словарь биологические процессы (GO:BP), словарь клеточные компоненты (GO:CC), словарь молекулярные функции (GO:MF), * - $FDR \leq 0,05$; ** - $FDR \leq 0,01$.

Далее для идентификации взаимодействий между продуктами ДЭГ и конкретных ДЭГ, определяющих эти взаимодействия, с помощью базы данных STRINGdb (Szklarczyk et al., 2019), были построены сети белок-белковых взаимодействий (PPI) для ДЭГ с повышенной и пониженной транскрипционной активностью. Было показано, что среди 92 ДЭГ с повышенной транскрипционной активностью 38 генов образовывали общую сеть взаимодействий, включающую 2 кластера генов, объединяемых единственным геном TNF, имеющим наибольшее количество взаимодействий. Ген TNF кодирует плейотропный цитокин ФНО-альфа, известный активатор провоспалительных сигнальных путей (рис. 6а) (Webster, Vucic 2020). При анализе взаимодействий между

продуктами ДЭГ с пониженной транскрипционной активностью, было показано, что из 29 ДЭГ единую сеть взаимодействий образуют 6 генов, относящихся к семейству белков металлотионеинов, контролирующих гомеостаз цинка, участников противовоспалительного ответа (рис. 6б) (Jarosz et al., 2017).

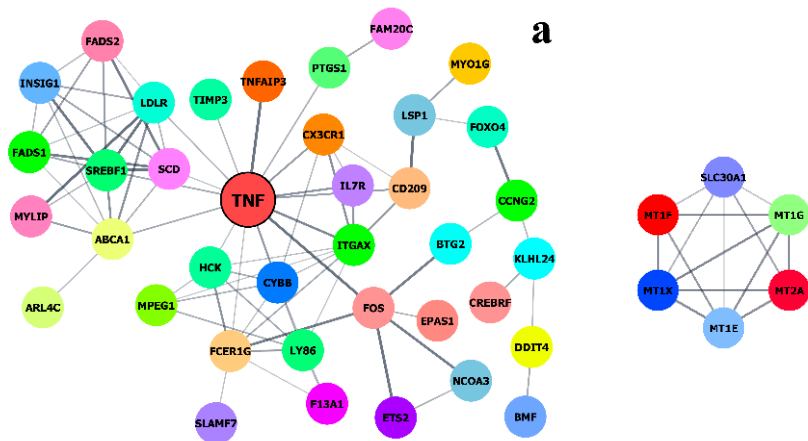


Рисунок 6. Сети белок-белковых взаимодействий продуктов ДЭГ у клеток THP-1 в ВПК с повышенной (а) и пониженной транскрипционной активностью (б).

Хорошо известно, что цитокин ФНО-альфа регулирует внутриклеточные сигнальные каскады путем активации транскрипционного фактора NF- κ B, под транскрипционным контролем которого находится множество провоспалительных и антиапоптотических генов, что особенно важно в контексте повышения резистентности к TRAIL-индуцированной гибели (Yu et al., 2020). Поэтому для идентификации транскрипционной активности сигнальных путей, был проведен анализ обогащения для наборов генов (GSEA, Gene Set Enrichment Analysis) из всех данных секвенирования транскриптома (Subramanian et al., 2005). Для этого были выбраны набор генов, продукты которого, образуют сигнальный путь ФНО-альфа зависимой активации NF- κ B (TNFA_SIGNALING_VIA_NFKB), коллекции Hallmark и наборы генов, содержащих последовательности для связывания с транскрипционным фактором NF- κ B, субколлекции TFT_LEGACY, коллекции TFT базы данных MSigDB (Molecular Signatures Database) (Liberzon et al., 2011). Целесообразность данного подхода основана на том, что в GSEA анализируются не только ДЭГ, а вся совокупность

транскрибируемых генов, что в свою очередь, позволяет оценить изменения (активацию/деактивацию) сразу всего исследуемого сигнального пути или всех исследуемых генов-мишеней независимо от изменения их транскрипционной активности (Subramanian et al., 2005).

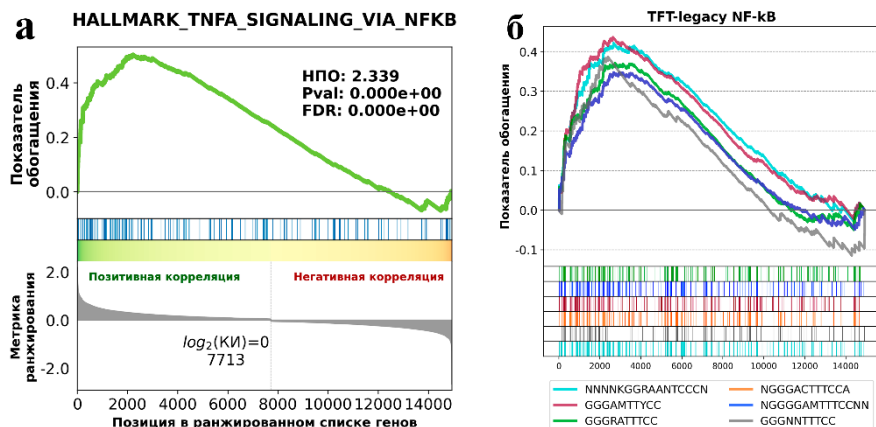


Рисунок 7. GSEA анализ набора генов TNFA_SIGNALING_VIA_NFKB (а) и наборов генов, содержащих последовательности для связывания с NF-kB (б), где N - любой нуклеотид, K - G или T/U, R - A/G, M - A/C, Y - C или T/U. FDR $\leq 0,05$.

Было показано, что у клеток в ВПК по отношению к НПК происходит обогащение набора генов TNFA_SIGNALING_VIA_NFKB, что отражает активность сигнального пути ФНО-альфа зависимой активации NF-kB (рис. 7а). Также у клеток в высокоплотной культуре было показано обогащение всех наборов генов, содержащих последовательности для связывания с NF-kB, отражающее суммарную активацию их транскрипционной активности (рис. 7б).

Таким образом, у клеток ОМЛ THP-1 в ВПК происходит активация внутриклеточных провоспалительных сигнальных и метаболических путей, регулируемых ФНО-альфа, посредством NF-kB-опосредованной транскрипции.

3. Анализ сигнального пути TRAIL у клеток THP-1 в трехмерных культурах высокой плотности

Одной из основных причин повышения устойчивости опухолевых клеток к TRAIL-индуцированной гибели считается снижение поверхностной экспрессии проапоптотических рецепторов TRAILR1/DR4 и TRAILR2/DR5, а также повышение поверхностной экспрессии

антиапоптотических рецепторов TRAILR3/DcR1 и TRAILR4/DcR2 (Ralf, El-Deiry 2018). Поэтому мы исследовали поверхностную экспрессию про- и антиапоптотических TRAIL-рецепторов у клеток ОМЛ ТНР-1 в высокоплотной культуре (ВПК), с помощью проточной цитометрии. Так как выше представленные данные показывают, что у клеток ОМЛ ТНР-1 в ВПК активированы внутриклеточные провоспалительные сигнальные пути, в качестве положительного контроля провоспалительной активации клетки ОМЛ обрабатывали липополисахаридом (ЛПС). Клетки ТНР-1, обработанные ЛПС, были резистентными к TRAIL-индуцированной гибели (данные не представлены в автореферате).

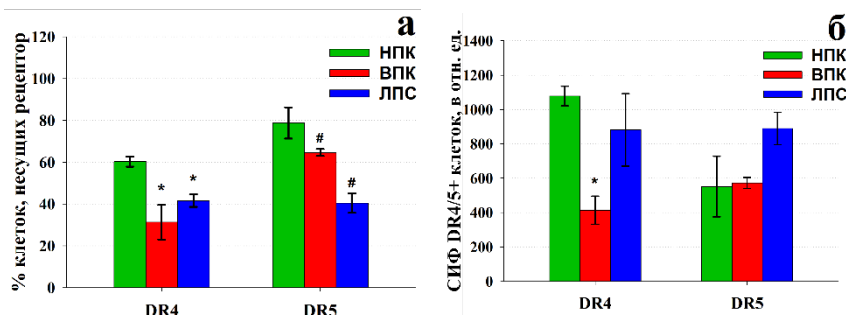


Рисунок 8. Анализ количества DR4/5-позитивных клеток (а) и поверхностной экспрессии DR4/5 (б) в ВПК клеток ТНР-1 по сравнению с НПК и клетками, обработанными ЛПС. Данные приведены в виде среднего значения $\pm$ SD ($n \geq 5$). * $p < 0.05$ в сравнении с клетками ТНР-1 в НПК.

Было показано, что в культуре высокой плотности (ВПК) клеток ОМЛ ТНР-1 количество DR4-позитивных клеток составляло $31 \pm 8\%$ в отличие от культуры низкой плотности (НПК), где количество DR4-позитивных клеток было $60 \pm 2,4\%$. Кроме этого, в ВПК количество DR5-позитивных клеток ТНР-1 было достоверно ($p \leq 0,05$) ниже чем в НПК, $65 \pm 4,8\%$ и $80 \pm 5,5\%$, соответственно. Схожие результаты были получены при обработке клеток ЛПС (рис. 8а).

Также, было показано, что у DR4-позитивных клеток, но не у DR5-позитивных клеток в ВПК происходило достоверное ($p \leq 0,05$) снижение интенсивности флуоресценции клеток, окрашенных соответствующими антителами, по сравнению с НПК, что указывает на уменьшение количества соответствующих рецепторов на внешней клеточной мембране. В случае с клетками, обработанными ЛПС, такого эффекта обнаружено не было (рис. 8б). При анализе поверхностной экспрессии

антиапоптотических TRAIL-рецепторов - DcR1 и DcR2, наличие данных рецепторов на поверхности клеток ТНР-1, как в ВПК, так в НПК и после обработки ЛПС, обнаружено не было.

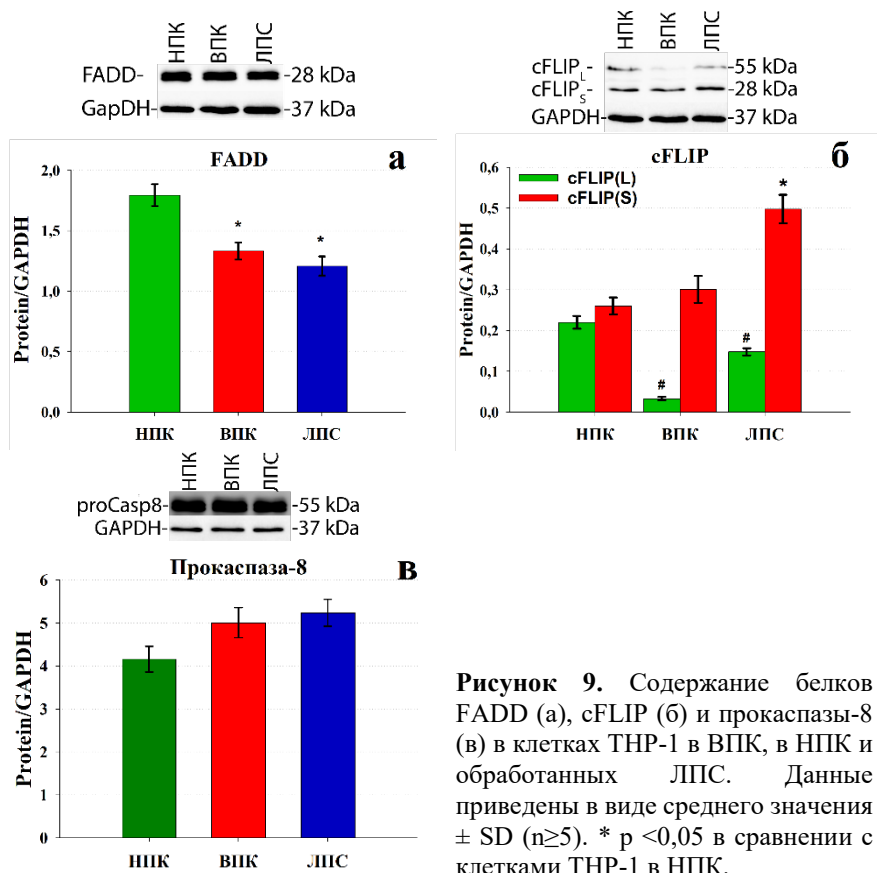


Рисунок 9. Содержание белков FADD (а), cFLIP (б) и прокаспазы-8 (в) в клетках ТНР-1 в ВПК, в НПК и обработанных ЛПС. Данные приведены в виде среднего значения $\pm$ SD ($n \geq 5$). * $p < 0,05$ в сравнении с клетками ТНР-1 в НПК.

Далее мы провели анализ внутриклеточного содержания известных цитоплазматических адапторных белков-партнеров проапоптотических TRAIL-рецепторов, таких как FADD (активатор апоптоза), прокаспазы-8 (активатор апоптоза) и cFLIP (ингибитор апоптоза) (Razeghian et al., 2021). Было показано, что у клеток ТНР-1 в ВПК, по сравнению с НПК происходит уменьшение содержания белка FADD, увеличение содержания прокаспазы-8, а также уменьшение содержания длинной формы белка cFLIP_L, не препятствующей аутокатализу каспазы-8 и повышение содержания короткой формы белка cFLIP_S, препятствующей аутокатализу

прокаспазы-8 (Smyth et al., 2020). Сходные изменения в содержании исследуемых белков были показаны для клеток, обработанных ЛПС (рис. 9).

Далее мы исследовали TRAIL-индуцированную активацию прокаспазы-8 у клеток в ВПК. Для этого клетки ТНР-1 в ВПК, в НПК и клетки, обработанные ЛПС инкубировали с 100 нг/мл izTRAIL в течении 1 и 2 часов и проводили оценку образования активной каспазы-8 (p18) и ключевого маркера активности каспазы-8 усеченной формы белка Bid – tBid (truncated Bid), известного активатора выхода цитохрома С и сборки апоптосомы (Flores-Romero et al., 2022).

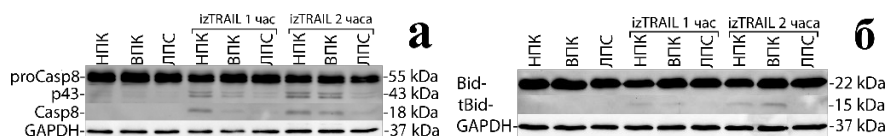


Рисунок 10. Анализ TRAIL-индуцированного образования активной каспазы-8 (а) и усеченной формы белка Bid (б) у клеток ТНР-1 в ВПК, в НПК и у клеток, обработанных ЛПС.

Мы обнаружили, что в высокоплотной TRAIL-резистентной культуре (ВПК) через 1 и 2 часа инкубации с izTRAIL начинается образование активной каспазы-8 (p18) и усеченной формы белка Bid – tBid. В случае клеток, обработанных ЛПС, инкубация с izTRAIL приводила к образованию крайне малого количества активной каспазы-8, но не формы tBid (рис. 10а, б). В тоже время, у клеток ТНР-1 в ВПК, как и в случае клеток, обработанных ЛПС, незначительно увеличивалась TRAIL-индуцированная активность эффекторных каспаз-3/7 (рис. 11а). Количество клеток содержащих неактивную форму поли(АДФ-рибоза)-полимеразы cPARP(Asp214), известного маркера апоптоза (Mashimo et al., 2021), в течение 8 часов инкубации с izTRAIL, в ВПК увеличилась до 16 ± 3 %, в НПК до 61 ± 4 % и у клеток, обработанных ЛПС повышалось до $12 \pm 2,5$ % (рис. 22б). Через 24 часа инкубации количество cPARP(Asp214)-позитивных клеток в ВПК не изменялось, составляло 18 ± 4 %, у клеток, обработанных ЛПС, составляло 13 ± 2 %.

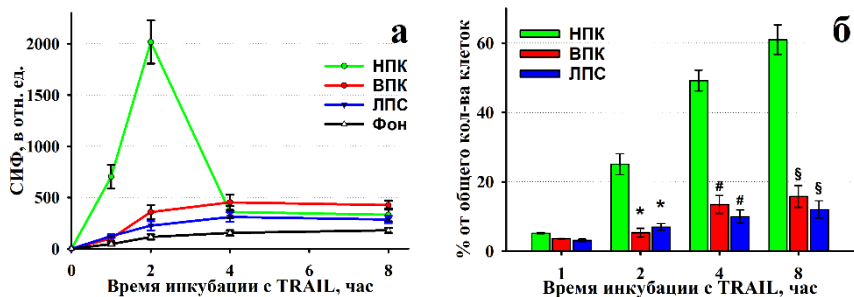


Рисунок 11. Оценка активности каспаз-3/7 (а) и содержания cPARP(Asp214) позитивных клеток THP-1 в ВПК, в НПК и у клеток, обработанных ЛПС, при инкубации с 100 нг/мл izTRAIL. Данные приведены в виде среднего значения $\pm$ SD ($n \geq 5$). * $p < 0,05$ в сравнении с клетками THP-1 в НПК.

Таким образом, у клеток ОМЛ THP-1 в высокоплотной TRAIL-резистентной культуре (ВПК) показано снижение содержания проапоптотического адаптерного белка FADD и повышение антиапоптотического белка cFLIP_S. В тоже время, при инкубации клеток в ВПК с izTRAIL, происходила активация каспазы-8 и образование активной формы (tBid) проапоптотического белка Bid. Однако активность эффекторных каспаз-3/7 в этих условиях изменялась не значительно. То есть у клеток в ВПК происходила TRAIL-индуцируемая активация апоптотического сигнала, которая существенно ингибировалась на уровне эффекторных каспаз.

4. Анализ внутриклеточных ингибиторов апоптоза у клеток THP-1 в трехмерных культурах высокой плотности

Хорошо известно, что каспаза 8 может индуцировать апоптотический каскад как за счет прямого процессинга эффекторных каспаз-3/7, так и опосредованно, через tBid-зависимую сборку апоптосомы с активацией каспазы-9, с последующим процессингом каспаз-3/7 (Han et al., 2021). В связи с тем, что при инкубации с izTRAIL у клеток ОМЛ THP-1 в высокоплотной TRAIL-резистентной культуре происходила активация каспазы-8 и образование tBid, но не существенное повышение активности каспаз-3/7, мы предположили, что данный эффект может быть связан с непосредственным ингибированием как активности каспаз-3/7, так и сборки апоптосомы. Основными внутриклеточными ингибиторами панкаспазной активности являются белки семейства IAP (BIRC), образующие комплексы с каспазами, с последующей их протеосомальной деградацией (Estornes, Bertrand 2015). Поэтому, мы исследовали

экспрессию всех членов семейства IAP у клеток ОМЛ ТНР-1 в ВПК и у клеток, обработанных ЛПС по сравнению с клетками в НПК, с помощью ОТ-ПЦР. Было показано, что у клеток в ВПК происходило достоверное увеличение ($p \leq 0,05$) в $4,8 \pm 1,5$ раза экспрессии Livin, ингибитора каспаз 3, 7 и 9 (Kim et al., 2021), по сравнению с клетками в НПК. В тоже время для клеток, обработанных ЛПС показано увеличение в $43 \pm 2,5$ раза экспрессии cIAP2, ингибитора каспаз 3, 7, 8 и 10 (Mohamed et al., 2017), по сравнению с клетками в НПК (рис. 12а).

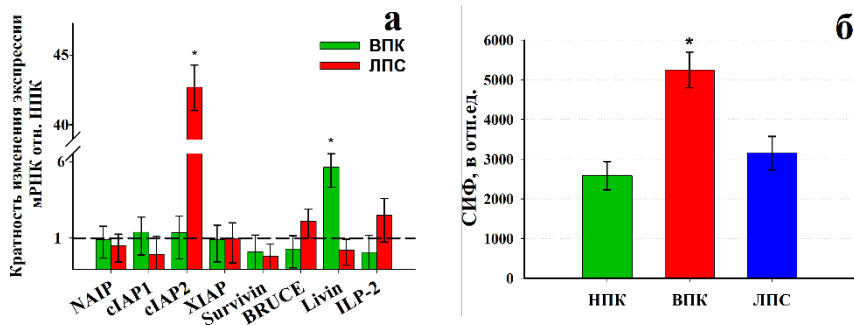


Рисунок 12. Оценка экспрессии мРНК генов семейства IAP (BIRC) (а) и внутриклеточного содержания антиапоптотического белка Bcl-2 у клеток ТНР-1 в ВПК и у клеток, обработанных ЛПС. Данные приведены в виде среднего значения $\pm$ SD ($n \geq 5$). * $p < 0,05$ в сравнении с клетками ТНР-1 в НПК.

Дополнительно, у клеток ОМЛ ТНР-1 в ВПК, в НПК и у клеток, обработанных ЛПС, с помощью проточной цитометрии, мы оценили внутриклеточное содержание белка Bcl-2, известного ингибитора выхода цитохрома С и сборки апоптосомы (Alam et al., 2021). Было показано, что у клеток в высокоплотной TRAIL-резистентной культуре (ВПК), происходило увеличение содержания белка Bcl-2. В случае с клетками, обработанными ЛПС, данного эффекта мы не обнаружили (рис.12б).

Таким образом, в высокоплотной, TRAIL-резистентной культуре клеток ОМЛ ТНР-1 происходит повышение экспрессии Livin, ингибитора активации каспаз-3, -7 и -9, а также повышение внутриклеточного содержания антиапоптотического белка Bcl-2, ингибитора выхода цитохрома С и сборки апоптосомы.

5. Оценка возможности подавления резистентности клеток ОМЛ к TRAIL-индуцированному апоптозу в трехмерных культурах высокой плотности

Была проведена оценка возможности снижения резистентности клеток ОМЛ THP-1 в ВПК к действию izTRAIL при применении стероидных (дексаметазон, преднизолон) и нестероидных (диклофенак, индометацин) и таргетных NF- κ B-ориентированных, (QNZ, NF- κ B-Activation Inhibitor IV, JSH-23) противовоспалительных соединений, а также ВНЗ миметика Navitoclax (ингибитор Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w). Для этого клетки THP-1 в ВПК предварительно инкубировали в течение 4 часов с данными ингибиторами, после чего обрабатывали izTRAIL в течение 20 часов.

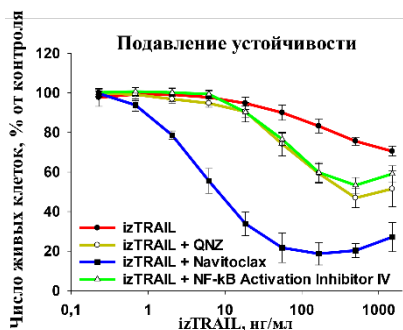


Рисунок 13. Снижение резистентности клеток THP-1 в ВПК к действию izTRAIL, при использовании таргетных противовоспалительных препаратов и ингибитора антиапоптотических белков семейства Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w (Navitoclax). Данные приведены в виде среднего значения $\pm$ SD ($n \geq 10$).

NF- κ B (JSH-23), не изменяли TRAIL-резистентность клеток THP-1 в ВПК (данные в автореферате не представлены). Ингибиторы активации NF- κ B (QNZ, NF- κ B-Activation Inhibitor IV) снижали устойчивость клеток в ВПК к действию izTRAIL, и наиболее эффективно TRAIL-резистентность снижалась при применении ВНЗ миметика Navitoclax (рис. 13.)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Накопление клеток ОМЛ в костном мозге (КМ) формирует уникальное микроокружение, способствующее не только прогрессии заболевания, но и формированию устойчивости к действию терапии (Skelding et al., 2022). В таких условиях существенно изменяется не только активность оставшихся здоровых гемопоэтических клеток, но также и протекторные функции иммунокомпетентных клеток (Pimenta et al., 2021). Особый интерес вызывает вопрос, как накопление «опухолевой массы» в весьма ограниченном пространстве КМ может воздействовать на

активность противоопухолевого иммунитета, прежде всего с точки зрения его возможной фармакологической коррекции. Цитокин TRAIL как элемент противоопухолевого надзора в организме человека выполняет основную эффекторную функцию - элиминацию злокачественно трансформированных клеток, путем запуска контролируемой клеточной гибели (Alizadeh Zeinabad, Szegezdi, 2022). Однако, в настоящее время крайне малое количество исследований посвящено изучению особенностей функционирования молекулярных и клеточных эффекторов противоопухолевого иммунитета в условиях специфического микроокружения, опосредуемого накоплением «опухолевой массы».

На основании полученных нами данных на рис. 14 представлен гипотетический механизм повышения TRAIL-резистентности у клеток ОМЛ в трехмерных высокоплотных культурах, имитирующих накопление лейкозных клеток в пространстве КМ. В высокоплотных TRAIL-резистентных культурах (ВПК) у клеток ОМЛ происходит ФНО-альфа регулируемая, посредством NF-kB-опосредованной транскрипции, активация внутриклеточных провоспалительных сигнальных и метаболических путей. На фоне провоспалительной активации у клеток ОМЛ в ВПК происходит снижение поверхностной экспрессии проапоптотических TRAIL-рецепторов DR4/5 и содержания внутриклеточного проапоптотического адаптерного белка FADD, а также повышение короткой формы антиапоптотического белка cFLIP_s. Интересно, что у клеток, обработанных ЛПС, классическим провоспалительным активатором, мы увидели сходные изменения в сигнальном пути TRAIL.

В тоже время, у клеток ОМЛ в высокоплотных TRAIL-резистентных культурах при инкубации с izTRAIL инициировалось образование активной каспазы-8 и активатора сборки апоптосомы, укороченной формы tBid, в отличие от клеток, обработанных ЛПС, где такого эффекта мы не наблюдали. Однако мы обнаружили незначительное повышение TRAIL-индуцированной активности эффекторных каспаз-3/7 и незначительное образование cPARP (Asp214) у клеток ОМЛ в ВПК, что свидетельствует об отсутствии развития TRAIL-индуцированного апоптоза. Мы связываем это с увеличением экспрессии ингибитора эффекторных каспаз Livin и ингибитора выхода цитохрома С и сборки апоптосомы белка Bcl-2 у клеток ОМЛ в ВПК. В случае с клетками, обработанными ЛПС ингибирование TRAIL-индуцированного апоптоза происходит на начальном этапе, путем блокирования активации инициаторных каспаз 8/10, за счет многократно возросшей экспрессии cIAP2.

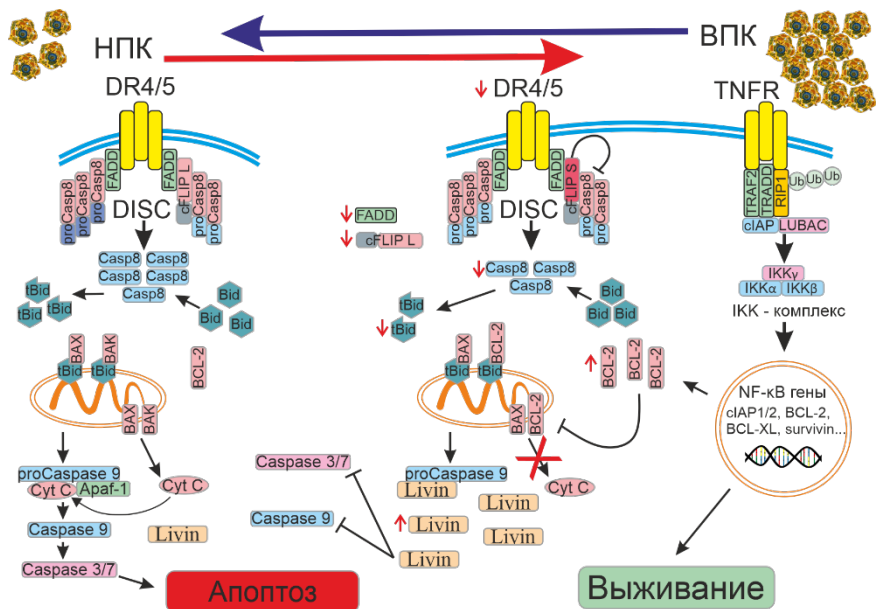


Рисунок 14. Гипотетический механизм повышения резистентности к TRAIL-индуцированному апоптозу у клеток ОМЛ THP-1 в трехмерных культурах высокой плотности.

Полученные результаты представляют интерес как для исследования основных сигнальных путей, изменяющихся в опухолевых клетках, так и для понимания молекулярных механизмов уклонения опухолевых клеток от иммунного надзора, а также показывают принципиальную возможность коррекции устойчивости опухолевых клеток к медиаторам противоопухолевого иммунитета.

ВЫВОДЫ

1. У клеток ОМЛ в трехмерных культурах высокой плотности происходит обратимое повышение резистентности к TRAIL-индуцированному апоптозу.
2. Повышение резистентности клеток ОМЛ к TRAIL-индуцированному апоптозу в трехмерных высокоплотных культурах непосредственно не связано с увеличением количества клеток и ограничениями доступа к клеткам.
3. Повышение TRAIL-резистентности у клеток ОМЛ в трехмерных высокоплотных культурах регулируется активацией TNF-NF-κB зависимых сигнальных путей и реализуется при участии

антиапоптотических белков Bcl-2 и Livin.

4. Резистентность клеток ОМЛ к TRAIL- индуцированному апоптозу в трехмерных культурах высокой плотности подавляется ВНЗ миметиком Navitoclax.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи:

1. The Increase in the Drug Resistance of Acute Myeloid Leukemia THP-1 Cells in High-Density Cell Culture Is Associated with Inflammatory-like Activation and Anti-Apoptotic Bcl-2 Proteins / M. Kobyakova, Y. Lomovskaya, **A. Senotov**, A. Lomovsky, V. Minaychev, I. Fadeeva, D. Shtatnova, K. Krasnov, A. Zvyagina, I. Odinkova, V. Akatov, R. Fadeev // Int. J. Mol. Sci. – 2022. – Vol. 23(14). P. 7881.

2. Появление признаков дифференцировки и провоспалительного фенотипа у клеток острого миелоидного лейкоза THP-1 при повышении их TRAIL-резистентности в агрегатах *in vitro* / М.И. Кобякова, Я.В. Евстратова, **А.С. Сенотов**, А.И. Ломовский, В.В. Минайчев, А.И. Звягина, М.Е. Соловьева, И.С. Фадеева, В.С. Акатов, Р.С. Фадеев // Биол. мембраны. – 2021. – Т. 38, № 1. - с. 61–70.

3. Improved Anticancer Effect of Recombinant Protein izTRAIL Combined with Sorafenib and Peptide iRGD / R. Fadeev, A. Chekanov, M. Solovieva, O. Bezborodova, E. Nemtsova, N. Dolgikh, I. Fadeeva, **A. Senotov**, M. Kobyakova, Y. Evstratova, R. Yakubovskaya, V. Akatov // Int. J. Mol. Sci. – 2019. – Vol. 20(3). P. 525.

4. Клеточная агрегация повышает лекарственную устойчивость клеток острого миелоидного лейкоза / Р.С. Фадеев, М.Е. Соловьева, Д.А. Слядовский, С.Г. Захаров, И.С. Фадеева, **А.С. Сенотов**, Н.В. Долгих, А.К. Голенков, В.С. Акатов // Биологические мембраны: Журнал мембранной и клеточной биологии. - 2015. - Т. 32. № 2. - с. 125-134.

5. Ингибирование активации NF-kB снижает устойчивость клеток острого миелоидного лейкоза к TRAIL-индуцированному апоптозу в многоклеточных агрегатах / Р.С. Фадеев, М.Е. Соловьева, Д.А. Слядовский, С.Г. Захаров, И.С. Фадеева, **А.С. Сенотов**, А.К. Голенков, В.С. Акатов // Биофизика. - 2015. - Т. 60, № 6. - с. 1146-1150.

Монографии

1. Повышение лекарственной устойчивости клеток острого миелоидного лейкоза в многоклеточных агрегатах / Р.С. Фадеев, М.И. Кобякова, С.Г. Захаров, И.С. Фадеева, **А.С. Сенотов**, Т.А. Митина, А.К. Голенков, В.С. Акатов // В кн.: «Митохондриальные поры, каналы и устойчивость клеток к повреждающим воздействиям». Изд.: Synchrobook - 2016. - с. 172-182.

Патенты

1. Патент №2653442 Российская Федерация, МПК C12N 5/00 (2006.01). Способ персонифицированного скрининга действия веществ на лейкозные клетки *ex vivo* : №2015156455 : заявл. 29.12.2015 : опубл. 04.07.2017 / Акатов В.С., Фадеев Р.С., Фадеева И.С., **Сенотов А.С.**, Митина Т.А., Захаров С.Г., Голенков А.К. – 13 с. : ил. – Текст : непосредственный.

По результатам работы опубликовано более 15 тезисов в сборниках материалов конференций.

Работа выполнена при финансовой поддержке договора №14.Z50.31.0028, в рамках постановления Правительства РФ от 09.04.10 №220 «Мегагранты».