

На правах рукописи



МОХАМЕД ИСЛАМ САБЕР ЕАД

**Молекулярные механизмы, опосредующие противоопухолевую
активность бычьей панкреатической РНКазы А и микробной
рибонуклеазы *Bacillus pumilus* (биназы)**

1.5.3 – молекулярная биология

Автореферат
диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Новосибирск – 2022

Работа выполнена в Новосибирском государственном университете и Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

Научный руководитель:

Миронова Надежда Львовна, д.б.н.

Официальные оппоненты:

Рыкова Елена Юрьевна, д.б.н.,

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», в.н.с.

Толстикова Татьяна Генриховна, д.б.н., профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова Сибирского отделения Российской академии наук, зав. лабораторией

Каюмов Айрат Рашитович, д.б.н.,

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет», в.н.с.

Защита состоится «08» Июля 2022 г. в 12⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета ИХБФМ.03.01 при Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН по адресу: 630090, Новосибирск, просп. акад. Лаврентьева, 8

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

С авторефератом можно ознакомиться на сайте www.niboch.nsc.ru

Автореферат разослан « 6 » Июня 2022 г.

Учёный секретарь диссертационного совета
к.х.н.,



Коваль В. В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Открытое в 50-х годах прошлого века токсическое действие экзогенных рибонуклеаз (РНКаЗ) на опухолевые клетки послужило поводом для изучения этих ферментов в качестве противоопухолевых препаратов. Исследователи обратили внимание на экзогенные РНКазы различного происхождения, для которых была обнаружена цитотоксическая и противоопухолевая активность - BS-РНКазу (РНКаза семенников быка) (Lee and Raines, 2005), онконазу (РНКаза из ооцитов *R. pipiens*) (Lee et al., 2000) и ряд микробных РНКаЗ (Mitkevich et al., 2011; Mironova et al., 2013).

РНКаза А из поджелудочной железы крупного рогатого скота (РНКаза А) представляет собой небольшой белок (124 аминокислоты, 13,7 кДа), обладает самой высокой каталитической активностью среди белков семейства и была одной из первых рибонуклеаз, для которой была изучена цитотоксическая активность в отношении опухолевых клеток. Первые эксперименты показали, что РНКаза А не проявляет цитотоксического действия *in vitro*, а *in vivo* оказывает слабое противоопухолевое действие. В одних исследованиях было показано, что РНКаза А ингибирует рост опухоли у мышей и крыс в дозах до 1000 мг/кг, в то время как в других - наблюдалось отсутствие как цитотоксического, так и противоопухолевого действия. Отсутствие противоопухолевого действия РНКазы А объясняли ее инактивацией под действием связывания с внутриклеточным ингибитором рибонуклеаз (RI) (Johnson et al., 2007). Однако, несмотря на связывание с RI димерные формы РНКазы А проявляли значительный противоопухолевый эффект (Naddeo et al., 2005). Именно эти противоречивые данные заставили исследователей вернуться к изучению противоопухолевого потенциала РНКазы А.

Микробные рибонуклеазы, к которым относятся барназа из *B. atyloliquefaciens* (Uyanova et al., 2011) и биназа из *B. pumilus* (Makarov et al., 2008), представляют интерес для исследователей с точки зрения их возможной противоопухолевой активности. Эти рибонуклеазы относятся к семейству РНКазы T1, и, хотя они существенно (на четыре порядка) менее активны, чем РНКаза А, обладают значительной цитотоксической активностью по отношению к опухолевым клеткам, так как не связываются с RI. Кроме того, в нескольких работах была продемонстрирована противоопухолевая активность биназы с использованием разных опухолевых моделей мыши.

За последние 10 лет на различных мышинных моделях опухолей были получены данные, свидетельствующие о высоком противоопухолевом и антиметастатическом потенциале РНКазы А в дозах, не превышающих 10 мкг/кг (Patutina et al., 2011). Открытие внеклеточных циркулирующих РНК и выяснение их роли в опухолевой прогрессии и распространении метастазов позволило предположить, что эти РНК вместе с внутриклеточными РНК могут быть молекулярными мишенями РНКазы А и других экзогенных РНКаЗ.

Исследования, направленные на идентификацию молекулярных мишеней РНКазы А в опухолевой ткани и крови мышей-опухоленосителей (на примере

карциномы легких Льюис) показали, что возможный механизм, лежащий в основе противоопухолевой и антиметастатической активности РНКазы А, заключается в деградации циркулирующих РНК, включая миРНК, и изменение паттернов миРНК в опухолевой ткани, а рибонуклеазная активность РНКазы А играет решающую роль в этих событиях. На уровне транскриптома РНКазы А вызывала перестройку внутриклеточных сетей опухолевых клеток, обеспечивающую усиление активности энергетических каскадов, торможение процессов клеточной пролиферации и диссеминации, частичное истощение сигнальных путей, проявляющих опухолестимулирующую активность.

Таким образом, существуют отдельные элементы мозаики, из которых можно составить картину противоопухолевого и антиметастатического действия РНКазы А. Однако, накопив большое количество данных о влиянии РНКазы А на прогрессирование опухолей *in vivo*, лишь несколько исследований были посвящены тому, что происходит в опухолевых клетках *in vitro*. Более того, вопрос о влиянии РНКазы А на внутриклеточные РНК до сих пор остается открытым.

Было показано, что биназа проявляет цитотоксическую активность по отношению к опухолевым клеткам, экспрессирующим некоторые онкогены, такие как KIT, AML1-ETO и FLT3 (Mitkevich et al., 2011). Биназа вызывает расщепление внутриклеточных РНК и индуцирует внутренний путь апоптоза посредством изменений митохондриального потенциала и внешний путь апоптоза за счет повышения экспрессии некоторых проапоптотических генов и активацию инициаторных каспаз. Тем не менее, влияние РНКазной активности биназы и участие ее РНК-мишеней в наблюдаемом противоопухолевом эффекте до сих пор не изучено.

Наиболее важной особенностью прогрессирования опухоли является активация регуляторных каскадов, направленных на сохранение выживаемости опухолевых клеток, что позволяет поврежденным клеткам адаптироваться к селективному давлению и ускользать от терапевтических препаратов, а также привлекать соседние нормальные клетки, которые образуют микросреду опухоли для стимуляции собственного роста и инвазии. Применение РНКаз в качестве противоопухолевых агентов может сбалансировать патологические молекулярные изменения, происходящие в опухолевых клетках, и, таким образом, контролировать их злокачественное перерождение и дальнейшие события опухолевой прогрессии.

Таким образом, выяснение ключевых этапов взаимодействия экзогенных рибонуклеаз биназы и РНКазы А с опухолевыми клетками *in vitro* и *in vivo* является крайне актуальным

Целью исследования являлось выяснение молекулярных механизмов, опосредующих противоопухолевую активность бычьей панкреатической РНКазы А и микробной рибонуклеазы *B. pumilus* (биназы). В ходе исследования решались следующие задачи:

1. Изучение накопления РНКазы А в опухолевых клетках и ее внутриклеточной локализации, включая совместную локализацию с R1.

2. Исследование роли гетеродимерного внутриклеточного белка Ku70/Ku80 во внутриклеточном накоплении РНКазы А.

3. Изучение способности РНКазы А и биназы влиять на жизнеспособность, миграционные и инвазивные свойства опухолевых клеток *in vitro*.

4. Анализ корреляций между цитотоксическим (*in vitro*) и противоопухолевым (*in vivo*) эффектами рибонуклеаз и изменением профилей миРНК в опухолевых клетках/тканях, метастатических очагах/прилегающих тканях и сыворотке крови.

5. Биоинформационный анализ миРНК, чувствительных к биназе и РНКазе А, их генов-мишеней и регуляторных сетей для выявления основных биологических процессов, модулируемых этими РНКазами в опухоли и ее микроокружении.

Научная новизна полученных результатов. Впервые показано, что РНКазы А эффективно накапливаются в клетках меланомы В16 мыши и клетках эпидермоидной карциномы шейки матки HeLa человека. После проникновения РНКазы А в клетки HeLa и В16 часть фермента остается свободной, не связанной с ингибитором рибонуклеаз, что приводит к снижению уровня цитозольных РНК в обоих типах клеток и рРНК в ядрышках клеток HeLa. Показано, что РНКазы А после проникновения в клетки ко-локализуется вместе с внутриклеточным гетеродимерным белком Ku70/Ku80 в цитозоле и ядре клеток, что может указывать на образование комплекса РНКазы А с белком Ku70/Ku80 и его участие в ее внутриклеточном транспорте.

Показано, что РНКазы А подавляет миграцию и инвазию опухолевых клеток *in vitro*, но не подавляет их жизнеспособность; биназа снижает жизнеспособность опухолевых клеток за счет индукции апоптоза и подавляет их миграцию. Впервые на метастатической модели меланомы В16 *in vivo* показано, что РНКазы А подавляет метастазирование в легкие, меняет профиль миРНК и экспрессию ЕМТ-маркеров в ткани, прилегающей к очагам метастазирования, разрушая формирование благоприятного микроокружения опухоли. На модели лекарственно-устойчивой лимфосаркомы RLS₄₀ показано, что биназа замедляет рост первичной опухоли, подавляет развитие метастазов в печени и меняет профиль миРНК в опухолевой ткани, что сопровождается снижением в ней реактивной воспалительной инфильтрации и количества митозов.

Впервые показано, что основными биологическими процессами, модулируемыми РНКазой А в микроокружении опухоли, являются регуляция клеточной адгезии, а также сигнальные пути, связанные с ЕМТ и опухолевой прогрессией. Основными событиями, модулируемыми биназой в опухолевой ткани, являются пролиферация, миграция, апоптоз и сигнальные пути, связанные с опухолевой прогрессией.

Практическая значимость. Автором на опухолевых моделях *in vivo* выявлен ряд миРНК опухолевой ткани и метастатических очагов, которые могут быть

использованы у человека в качестве молекулярных маркеров ответа на лечение и мишеней для ген-направленной терапии. Доказан высокий антиметастатический потенциал бычьей панкреатической РНКазы А на модели метастатической меланомы мыши, характеризующейся высокой агрессивностью и скоростью диссеминации, что позволяет рассматривать эту РНКазу как перспективный препарат для терапии метастазирующих опухолей.

Методология и методы исследования. В работе применялись стандартные методы выделения РНК, ПЦР в реальном времени, методы оценки миграции и инвазии опухолевых клеток, метод проточной цитофлуорометрии, метод конфокальной микроскопии, методы молекулярного моделирования и биоинформатического анализа. В работе использовали стандартные методы работы с культурами клеток *in vitro* и с опухолевыми моделями на мышах *in vivo* в соответствии с этическими протоколами.

Положения, выносимые на защиту

1. РНКазы А эффективно накапливается в клетках меланомы В16 мыши и эпидермоидной карциномы шейки матки HeLa человека. После проникновения РНКазы А в клетки HeLa и В16 часть фермента остается не связанной с ингибитором рибонуклеаз, что приводит к снижению уровня внутриклеточных РНК в обоих типах клеток.

2. РНКазы А подавляет миграцию и инвазию ряда опухолевых клеток *in vitro*, но не влияет на их жизнеспособность. Биназа снижает жизнеспособность опухолевых клеток за счет индукции апоптоза и подавляет их миграцию.

3. РНКазы А подавляет метастазирование в легкие мышей с метастатической меланомой В16, меняет профиль миРНК и экспрессию ЕМТ-маркеров в ткани, прилегающей к очагам метастазирования, разрушая формирование благоприятного микроокружения опухоли.

4. Биназа замедляет рост первичной лекарственно-устойчивой лимфосаркомы RLS₄₀, подавляет развитие метастазов в печени и меняет профиль миРНК в опухолевой ткани, что сопровождается снижением в ней пролиферативного потенциала.

5. Основными биологическими процессами, модулируемыми миРНК, чувствительными к РНКазе А, в микроокружении опухоли являются регуляция клеточной адгезии, а также сигнальные пути, связанные с эпителиально-мезенхимальным переходом.

6. Основными событиями, модулируемыми миРНК, чувствительными к биназе, в опухолевой ткани являются пролиферация, апоптоз, миграция и сигнальные пути, связанные с опухолевой прогрессией.

Апробация работы и публикации. Работа была представлена на российских и международных конференциях в виде устных и постерных докладов: «57-ая Международная научная студенческая конференция» (Новосибирск, 2019), Всероссийская мультikonференция с участием международных компаний «Биотехнология - медицине будущего» (Новосибирск, 2019), 4th ICNHBAS

(Хургада, Египет, 2019), «I Объединенный научный форум, VI съезд физиологов СНГ, VI съезд биохимиков России, IX Российский симпозиум «Белки и пептиды» (Сочи, Россия, 2019), «57-я Международная научная студенческая конференция» (Новосибирск, Россия, 2020), «Биотоп 2020: актуальные вопросы современной биологии» (Новосибирск, Россия, 2020), школа молодых ученых Molbd 2021 «Молекулярные основы заболеваний: что молекулярная биология может сделать для современной медицины» (Новосибирск, Россия, 2021), «Microbiology: yesterday, today and tomorrow» (Казань, Россия, 2021). По материалам диссертации опубликовано 3 работы, из них 1 публикация в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК РФ и 2 публикации в международных научных журналах, включенных в список базы данных Scopus и Web of Science.

Личный вклад соискателя. Представленные в работе экспериментальные данные получены лично автором, либо при его непосредственном участии на всех этапах исследования, включая планирование и проведение экспериментов, обработку, оформление и публикацию результатов. Эксперименты с животными на опухолевых моделях проведены совместно с к.м.н. Сеньковой А.В. (ИХБФМ СО РАН). Эксперименты по исследованию противоопухолевого действия биназы спланированы и проведены совместно с д.б.н. Митькевичем В.А. (Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН) и Надыровой А. И. (Институт фундаментальной медицины и биологии Казанского (Приволжского) федерального университета, Казань). Эксперименты по конфокальной микроскопии проведены совместно с к.б.н. Марковым О.В. (ИХБФМ СО РАН). Биоинформатический анализ проведен под руководством к.б.н. А.В. Маркова. Патоморфологический анализ гистологических образцов и биохимический анализ крови проведен к.м.н. Сеньковой А.В. и Савиным И.А. (ИХБФМ СО РАН). Молекулярное моделирование проведено к.б.н. Марковым А.В.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов исследования, их обсуждения, выводов и списка использованной литературы. Работа оформлена на 145 страницах машинописного текста, содержит 10 таблиц и 27 рисунков. Библиография включает 310 наименований.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Исследование влияния РНКазы А на снижение злокачественного потенциала опухоли

1.1. Внутриклеточное накопление и локализация конъюгата РНКазы А-биотин и его взаимодействие с RI в клетках В16 и HeLa

На первом этапе было исследовано проникновение и внутриклеточное накопление РНКазы А на клетках двух клеточных линий - меланомы В16 мышцы нейроэктодермального происхождения и клетках эпидермоидной карциномы человека HeLa эпителиального происхождения - с помощью конфокальной микроскопии. Для этой цели был получен конъюгат РНКазы А с биотином и было показано, что этот конъюгат сохраняет рибонуклеазную активность. Клетки В16 и HeLa инкубировали в присутствии конъюгата РНКазы А-биотин в течение 4 ч,

окрашивали стрептавидином-APC для визуализации РНКазы А (панель R), антителами к RI (панель G), NucBlue для визуализации ядер (панель B) и анализировали с помощью конфокальной микроскопии (Рис. 1, А-Б).

Полученные данные показали, что РНКазы А эффективно накапливается в цитозоле клеток В16 и HeLa (Рис. 1, А и Б, R). В клетках В16 РНКазы А равномерно распределена по всей цитоплазме, тогда как в клетках HeLa часть РНКазы А локализована вблизи ядра (Рис. 1, А, Б). RI локализуется по всей цитоплазме клеток (Рис. 1, А, и Б, G). После проникновения в клетки В16 РНКазы А практически полностью связывается с RI (Рис. 1, А Merge и Z-stack). В клетках HeLa только часть РНКазы А связана с RI в области, близкой к ядру (Рис. 1, Б, Merge), тогда как вблизи цитоплазматической мембраны РНКазы А остается в свободном состоянии (Рис. 1, Б, Z-stack, красный сигнал).

Конъюгат РНКазы А-биотин накапливается в клетках В16 и HeLa с разной эффективностью (Рис. 1, В - Е). При низких концентрациях конъюгата (1 – 5 мкМ) количество флуоресцентных клеток составило 3 – 13 % для В16 и 2 – 4 % для HeLa (Рис. 1, В, Г). Увеличение концентрации конъюгата до 10 и 20 мкМ приводило к увеличению эффективности его накопления в клетках В16 до 42% и 68%,

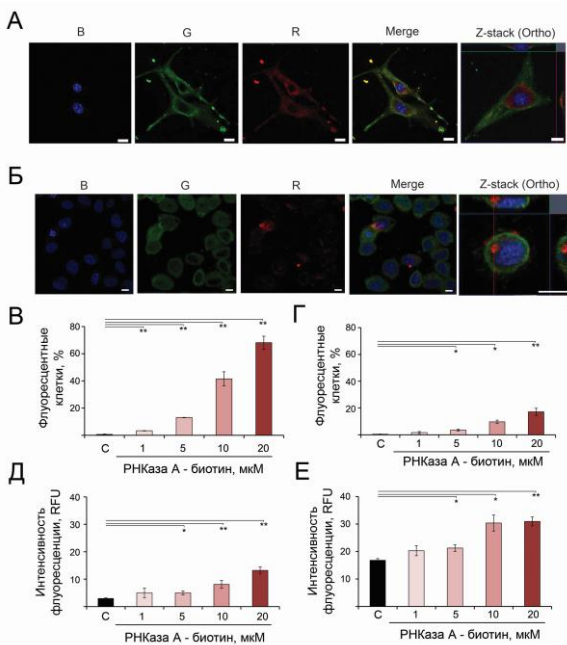


Рис. 1. Накопление РНКазы А клетках В16 и HeLa и локализация с RI. **А** и **Б.** Флуоресцентная визуализация РНКазы А и RI в клетках В16 и HeLa. Данные конфокальной микроскопии. В - NucBlue; G – RI-FITC, R – APC (конъюгат РНКазы А-биотин/ стрептавидин). Масштаб: 10 мкм.

Эффективность проникновения конъюгата РНКазы А-биотин в клетки В16 (**В** и **Д**) и HeLa (**Г** и **Е**). Клетки В16 и HeLa инкубировали с конъюгатом в (1 - 20 мкМ) при 37°C в течение 4 ч и анализировали с помощью проточной цитометрии. Данные анализировали с помощью t-теста Стьюдента и представляли как MEAN ± SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. С (контроль) – интактные клетки.

соответственно, однако, уровень накопления конъюгата в клетках HeLa составил 10% и 17%, соответственно (Рис. 1, В, Г). Уровни интенсивности флуоресценции

увеличивались с увеличением концентрации конъюгата РНКазы А-биотин, достигая 13.2 и 30.0 RFU для клеток В16 и HeLa, соответственно (Рис. 1, Д, Е).

Таким образом, четко продемонстрировано, что РНКазы А проникает в клетки В16 и HeLa. В клетках В16 РНКазы А оказывается большей частью связанной с RI, тогда как в клетках HeLa большее количество РНКазы А остается в свободном состоянии.

1.2. Взаимодействие РНКазы А с гетеродимером Ku70/Ku80: молекулярное моделирование и внутриклеточное поведение

Ku белок является одним из клеточных белков, выполняющих множество функций. Гетеродимерный белок Ku70/Ku80 в ядре играет роль в репарации ДНК (Gottlieb and Jackson, 1993), тем не менее, в настоящее время появилось много свидетельств, что Ku белок выполняет и другие функции в цитозоле и на внешней мембране. Некоторые клетки млекопитающих используют Ku белок в ассоциированной с мембраной форме для взаимодействия со своим микроокружением, таким образом, Ku белок может играть роль в миграции и инвазии опухолевых клеток. Учитывая все вышесказанное, представлялось интересным изучить участие белка ее проникновении и внутриклеточном транспорте.

Поэтому на следующем этапе способность Ku70/Ku80 связываться с РНКазой А была проанализирована с помощью метода молекулярного моделирования. Для этого кристаллические структуры РНКазы А (1FS3, база данных белков RSCB) и гетеродимера Ku70/Ku80 (1JEQ, база данных белков RSCB) были освобождены от молекул воды с помощью BIOVIA Discovery Studio, и их способность связываться друг с другом была проанализирована с использованием двух независимых серверных платформ HDOCK и PatchDock. Проведенный анализ показал, что РНКазы А потенциально способна образовывать тримерный комплекс с Ku70/Ku80.

Далее с помощью конфокальной микроскопии было исследовано взаимодействие РНКазы А с Ku70/Ku80 на этапе проникновения РНКазы А в клетки В16 и HeLa (Рис. 2, В, Г). Видно, что Ku70/Ku80 локализован по всей цитоплазме клеток В16 и в околоядерном пространстве (Рис. 2, В, G). РНКазы А проникает в клетки В16 и накапливается в цитозоле (Рис. 2, В, R), но комплексов между РНКазой А и Ku70/Ku80 в клетках В16 не визуализируется (Рис. 2, В, Merge и Z-stack). В клетках HeLa Ku70/Ku80 локализовался, в основном, внутри ядра и в гораздо меньшем количестве в цитоплазме, а РНКазы А локализовалась в ядре и цитоплазме (Рис. 2, Г, G и R). На панели слияния наблюдается значительное снижение красного и зеленого сигналов, соответствующих РНКазе А и гетеродимеру Ku70/Ku80, что свидетельствует об образовании между ними комплекса (Рис. 2, Г, Merge и Z-stack).

Поскольку Ku70/Ku80 способен перемещаться между ядром и цитоплазмой, а большое количество этого белка содержится в ядре клеток HeLa, возможно, что РНКазы А оказывается в ядре за счет ее транслокации в составе комплекса с Ku70/Ku80, что также не может быть исключено для клеток В16.

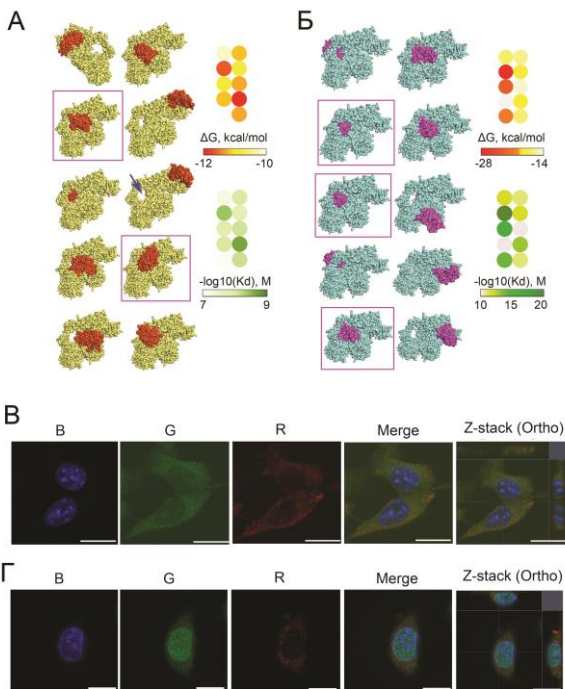


Рис. 2. Взаимодействие РНКазы А с Ku70/Ku80. **А** и **Б.** Данные молекулярного моделирования с помощью HDOCK и PatchDock, соответственно. Ku70/Ku80 окрашен в желтый (**А**) или голубой (**Б**) цвет, РНКазы А окрашена в оранжевый (**А**) или сиреневый (**Б**) цвет. Синей стрелкой обозначена ДНК-связывающая петля, формируемая Ku70/Ku80. Докинг-комплексы, характеризующиеся наименьшими значениями ΔG и Kd, выделены сиреневыми рамками. **В** и **Г.** Флуоресцентная визуализация РНКазы А и Ku70/80 в клетках В16 и HeLa, соответственно. В - NucBlue; G – FITC-mAb к Ku70/Ku80, R – APC (конъюгат РНКазы А-биотин/стрептавидин). Масштаб 10 мкм.

1.3. Влияние РНКазы А на клеточную РНК

Таким образом, часть РНКазы А в опухолевых клетках остается не связанной с RI, что свидетельствует о ее способности влиять на внутриклеточные РНК. Поэтому на следующем этапе с помощью конфокальной микроскопии было проведено исследование изменения содержания внутриклеточной РНК в клетках В16 и HeLa после инкубации клеток с РНКазой А и окрашивания SYTO RNaselect (Рис. 3, А, Б). В интактных клетках В16 и HeLa РНК визуализировалась по всей цитоплазме и внутри ядра (Рис. 3, Б). В ядрах клеток В16 и HeLa отчетливо видны ядрышки. РНКазы А в концентрации 20 мкМ вызвала снижение общего содержания РНК через 4 ч на 40 и 25% для клеток В16 и HeLa, соответственно. Инкубация клеток с РНКазой А в течение 48 ч приводила в клетках В16 к снижению содержания РНК на 80%. В клетках HeLa через 48 ч содержание РНК снижалось на 55% при той же концентрации РНКазы А. Интересен тот факт, что РНКазы А также уменьшала количество ядрышек в ядре и интенсивность их флуоресценции, что хорошо видно в клетках HeLa (Рис. 3, Б).

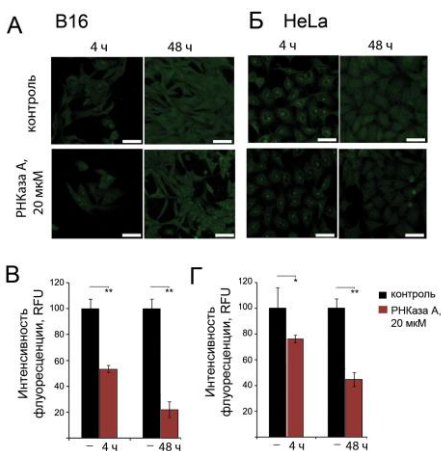


Рис. 3. Влияние РНКазы А на содержание РНК в клетках В16 мыши и HeLa человека. **А и Б.** Флуоресцентная визуализация РНК в клетках В16 и HeLa, соответственно. Клетки В16 и HeLa инкубировали в присутствии РНКазы А в диапазоне концентраций 1 - 20 мкМ в течение 4 и 48 ч, окрашивали SYTO RNaselect и анализировали с помощью конфокальной микроскопии. **В и Г.** Содержание РНК в клетках В16 и HeLa, соответственно. Анализ данных проводили с помощью t-теста Стьюдента и представляли как MEAN±SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

1.4. Влияние РНКазы А на подвижность, миграционную активность и инвазию клеток В16 и HeLa

Исследование влияния РНКазы А на жизнеспособность опухолевых клеток A549, HepG2, MCF-7, HuTu80, HeLa и В16 мыши проводили с помощью МТТ теста. Оказалось, что РНКазы А в диапазоне концентраций до 1 мг/мл не влияла на жизнеспособность опухолевых клеток. Влияние РНКазы А на миграционную активность клеток В16 было исследовано с помощью метода зарастания царапины. Видно, что инкубация клеток с РНКазой А (5 мкг/мл) в течение 24 ч приводила к 3-кратному снижению миграции клеток: площади царапин составили 60% в экспериментальных лунках и 18% в контрольных лунках относительно точки 0 (Рис. 4, А, Б). Инкубация клеток с РНКазой А в течение 48 ч вызывала более выраженное снижение миграции: площадь царапины составила 25% и 5% в экспериментальных и контрольных лунках, соответственно. За время инкубации 72 ч различий уже не наблюдалось (Рис. 4, А, Б). Подвижность клеток HeLa в присутствии РНКазы А в диапазоне концентраций 2.5, 5 и 10 мкг/мл измеряли с помощью “transwell migration assay” при стимуляции FBS в течение 48 ч в режиме реального времени (Рис. 4). РНКазы А вызывает подавление миграции клеток HeLa в 1.3 раза (Рис. 4, В). Влияние РНКазы А на инвазивный потенциал клеток HeLa отслеживали в 16-луночном СИМ-планшете, предварительно покрытом матригелем, при стимуляции FBS в режиме реального времени. Было обнаружено, под действием РНКазы А происходит замедление инвазии клеток HeLa в 1.8 раз (Рис. 4, Г).

1.5. Исследование антиметастатического действия РНКазы А на метастатической модели меланомы В16

Способность РНКазы А влиять на метастазирование изучали на модели метастатической меланомы В16 без первичного опухолевого узла. Метастатическую модель В16 индуцировали у мышей с помощью введения клеток В16 в латеральную хвостовую вену мышей линии C57Bl (Рис. 5, А).

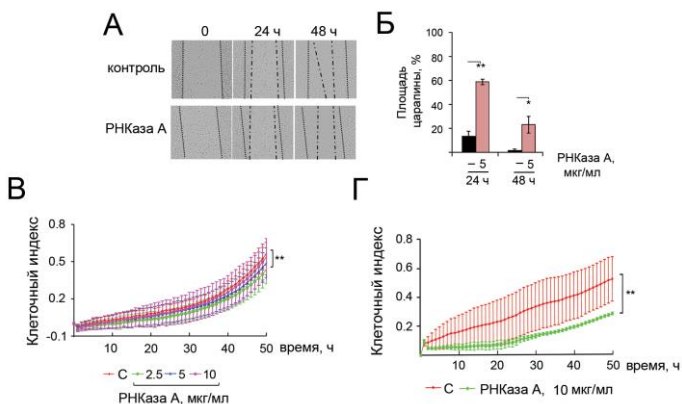


Рис. 4. Влияние РНКазы А на миграцию, подвижность и инвазию клеток V16 и HeLa. **А.** Фотографическое изображение заполнения царапины клетками V16 через 24 - 48 ч инкубации с РНКазой А (5 мкг/мл). Прерывистой линией отмечены границы начального повреждения монослоя; пунктирной линией – границы монослоя после инкубации с РНКазой А. Увеличение $\times 4$. **Б.** Площадь зарастания царапины в культуре клеток V16 через 24 - 48 ч инкубации с РНКазой А относительно контроля. **В.** Миграция клеток HeLa в присутствии РНКазы А при стимуляции FBS. Клетки HeLa в верхней камере инкубировали с РНКазой А (2.5 - 10 мкг/мл) в течение 48 ч. Миграцию клеток в нижнюю камеру анализировали в режиме реального времени с использованием xCELLigence. **Г.** Инвазия клеток HeLa в присутствии РНКазы А, стимулированной FBS сквозь матригель. Клетки HeLa инкубировали в верхней камере в присутствии РНКазы А (10 мкг/мл), и отслеживали скорость инвазии клеток в нижнюю камеру в режиме реального времени с помощью xCELLigence. Статистическую обработку данных проводили с использованием *t*-теста Стьюдента. Данные представлены как MEAN \pm SEM. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

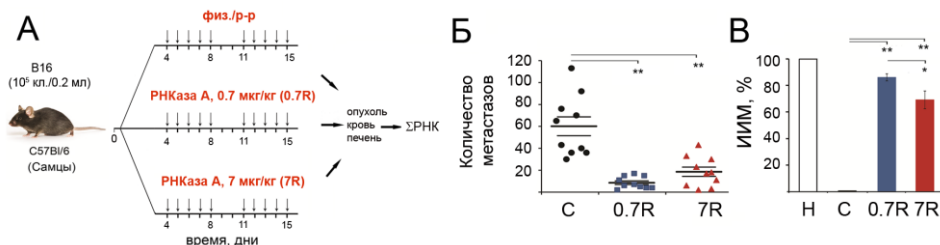


Рис. 5. Исследование действия РНКазы А на модели меланомы V16. **А.** Дизайн эксперимента. Клетки V16 (10⁵ клеток, 0.2 мл) имплантировали в/в мышам C57Bl/6. Начиная с 4-го дня после имплантации опухоли, животные получали физ./р-р (группа С) или РНКазу А в дозах 0.7 (группа 0.7R) и 7 (группа 7R) мкг/кг в/м ежедневно по схеме 5+2. Через 1 ч после последней инъекции собирали кровь и легочную ткань и использовали для анализа метастазов и уровня миРНК. **Б.** Количество поверхностных метастазов в легких у мышей с V16. **В.** ИИМ (индекс ингибирования метастазов). Данные анализировали с помощью ANOVA с критерием Тьюки и представляли как MEAN \pm SEM. * $p < 0.05$; ** $p < 0.1$.

Начиная с 4-х суток после имплантации опухоли животные были разделены на три группы: С (контроль) – получавшая физ./раствор в/м; 0.7 R и 7 R – получавших в/м. РНКазу А в дозах 0.7 и 7 мкг/кг, соответственно, по схеме 5+2 в течение двух недель. Используемые в исследовании дозы были выбраны в соответствии дозами, продемонстрировавшими эффективное ингибирование метастазирования на других опухолевых моделях (Patutina et al., 2011). Через час после последней инъекции у животных собирали образцы крови, ткань легких с метастатическими очагами и прилегающую легочную ткань для последующего гистологического анализа и оценки уровней экспрессии мРНК.

Оказалось, что введение РНКазы А мышам с В16 оказывает влияние как на количество поверхностных метастазов, так и на площадь поверхностных и внутренних метастазов (Рис. 5, Б – В). В легких контрольной группы среднее количество поверхностных метастазов составило 60.1 ± 8.6 . Введение РНКазы А в дозах 0.7 и 7 мкг/кг привело к снижению количества поверхностных метастазов в 7 и 3.2 раза и составило 8.6 ± 1.7 и 18.6 ± 4.3 , соответственно (Рис. 5, Б). Ингибирование развития поверхностных и внутренних метастазов оценивали путем подсчета индекса ингибирования метастазирования (ИИМ) с использованием морфометрического анализа. ИИМ поверхностных метастазов у мышей с меланомой В16, получавших РНКазу А в дозах 0.7 и 7 мкг/кг, составил 86 ± 2.7 и $69.1 \pm 6.7\%$, соответственно (Рис. 5, В). Таким образом, впервые была продемонстрирована способность РНКазы А подавлять развитие метастазов меланомы, которая характеризуется высокой агрессивностью и скоростью диссеминации.

2. Исследование влияния биназы на снижение злокачественного потенциала опухоли

2.1. Исследование влияния биназы на жизнеспособность и миграционную активность опухолевых клеток

Влияние биназы на жизнеспособность опухолевых клеток исследовали с помощью МТТ теста. Клетки легких А549, печени HepG2, молочной железы MCF-7, двенадцатиперстной кишки HuTu 80, меланомы В16 и лимфосаркомы RLS₄₀ инкубировали в присутствии биназы в диапазоне доз 2.5 – 100 мкг/мл при 37°C и 5%-ном CO₂ в течение 48 ч. Оказалось, что клетки HepG2, MCF-7 и А549 были слабо чувствительны к биназе, для них удалось достичь только значений IC₂₀, которая находилась в диапазоне >200. Клетки линий HuTu80, В16 и RLS₄₀ были чувствительны к биназе: IC₅₀ для этих клеточных линий составили 53, 91 и 99.5 мкг/мл, соответственно.

Для исследования миграционной активности целостность сформированного клетками HuTu80 монослоя нарушали нанесением царапины и измеряли скорость ее заполнения клетками в отсутствие (контроль) или в присутствии биназы в концентрации 10 мкг/мл (Рис. 6, А). Миграционная активность клеток HuTu80 под действием биназы через 24 ч снизилась по сравнению с контролем до 70%, после 48 ч инкубации - до 50% (Рис. 6, Б).

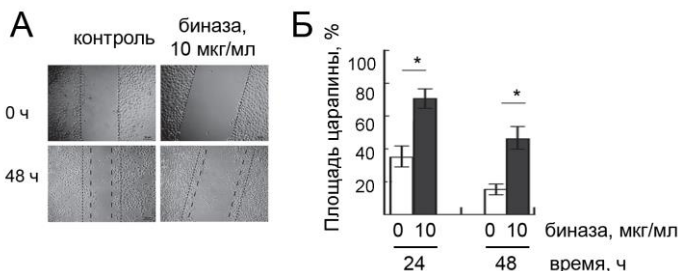


Рис. 6. Влияние биназы на миграцию клеток HuTu80. **А.** Фотографическое изображение заполнения царапины опухолевыми клетками HuTu80 через 48 ч инкубации в присутствии биназы (10 мкг/мл). Прерывистой линией отмечены границы изначального повреждения монослоя; пунктирной линией – границы монослоя после инкубации с биназой. Увеличение $\times 4$. **Б.** Площадь зарастания царапины в культуре клеток HuTu 80 через 24 и 48 ч инкубации с биназой (10 мкг/мл) относительно контроля. Данные анализировали с помощью *t*-теста Стьюдента и представляли как MEAN \pm SEM, * $p < 0.05$.

2.2. Влияние биназы на пролиферацию клеток RLS₄₀ и индукцию апоптоза

Была исследована способность биназы вызывать апоптоз в опухолевых клетках на примере клеток RLS₄₀. Для достижения выраженного эффекта была использована концентрация биназы, соответствующая 5-ти кратной IC₅₀. Показано, что цитотоксический эффект биназы на клетки RLS₄₀ реализуется за счет индукции апоптоза (Рис. 7, А). Процент клеток в состоянии позднего апоптоза в популяции, обработанной биназой (0.5 мг/мл, 48 ч), увеличился в 6.3 раза по сравнению с необработанными клетками и достиг 20% (Рис. 7, Б, правая панель, Annexin V FITC + / PI +, правый верхний квадрант). Индуцированный биназой апоптоз сопровождался активацией ключевых

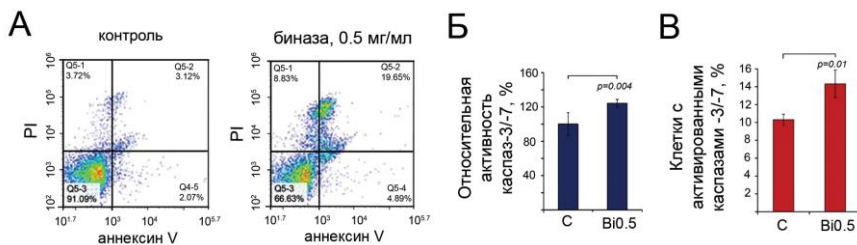


Рис. 7. Влияние биназы на индукцию апоптоза в клетках RLS₄₀. **А.** Данные цитофлуориметрии. Клетки инкубировали в присутствии биназы (0.5 мг/мл) в течение 48 ч, окрашивали Аннексин V FITC/PI. Нижний левый квадрант - % живых клеток, нижний правый - % клеток в состоянии раннего апоптоза, верхний правый - % клеток в состоянии позднего апоптоза, верхний левый - % некротизированных клеток. **Б.** Активация каспаз-3 / -7 в клетках RLS₄₀. **В.** Популяция клеток RLS₄₀ с активированными каспазами -3 / -7. C (контроль) – интактные клетки, Bio.5 – клетки, инкубированные в присутствии биназы (0.5 мг/мл). Данные анализировали с помощью *t*-теста Стьюдента и представляли как MEAN \pm SEM.

каспазы-3 и каспазы-7 в клетках RLS₄₀ (Рис. 7, Б). Более того, было обнаружено, что обработка клеток биназой приводила к накоплению клеток, активно экспрессирующих каспазы -3 и -7 (Рис. 7, В). Таким образом, полученные результаты продемонстрировали, что биназа подавляет жизнеспособность клеток лимфосаркомы RLS₄₀, вызывая каспаза-зависимый апоптоз.

2.3. Исследование противоопухолевого и антиметастатического действия биназы на модели RLS₄₀

Клетки RLS₄₀ имплантировали в/м мышам СВА и начиная с 4-го дня после имплантации животным вводили в/б физ./р-р или биназу в дозах 0.5 и 1 мг/кг три раза в неделю согласно схеме, представленной на Рис. 8 А. Через 1 ч после последней инъекции образцы опухоли, крови и печени собирали и использовали для анализа метастазов и уровня миРНК. В ходе эксперимента проводили измерение объема опухоли. Как видно из представленных данных на Рис. 8, Б, биназа значительно подавляла рост первичных опухолевых узлов:

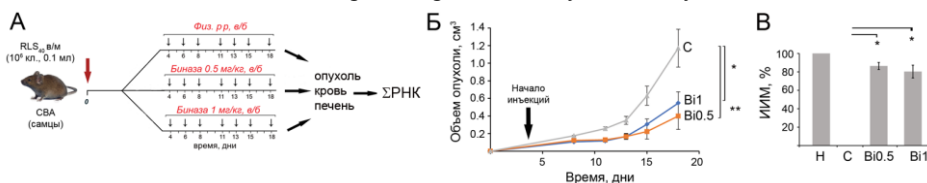


Рис. 8. Исследование действия биназы на модели RLS₄₀. **А.** Дизайн эксперимента. Клетки RLS₄₀ имплантировали в/м мышам СВА и с 4-го дня после имплантации животным вводили в/б физ./р-р (С) или биназу в дозах 0.5 (Вi0.5) и 1 (Вi1) мг/кг три раза в неделю. Через 1 ч после последней инъекции образцы опухоли, крови и печени собирали и использовали для анализа метастазов и уровня миРНК. **Б.** Динамика роста опухоли. Н – здоровые мыши. **В.** ИИМ. Данные анализировали с помощью ANOVA с критерием Тьюки и представляли как MEAN±SEM. **p* < 0.05; ***p* < 0.01.

при дозе биназы 0.5 мг/кг наблюдалось замедление роста опухоли на 60%. Двукратное увеличение дозы биназы не усиливало противоопухолевый эффект, поскольку замедление роста опухоли было примерно таким же без статистически значимой разницы между группами (Рис. 8, Б). Введение биназы приводило к подавлению роста метастазов. Расчет ИИМ на основе морфометрических измерений площади метастазов по отношению к общей площади печени показал, что биназа в обеих дозах эффективно подавляла развитие метастазов RLS₄₀ в печени с ИИМ 80–86% (Рис. 8, В).

Наряду с уменьшением объема опухоли биназа также вызывала изменения гистологических характеристик опухолей. Морфометрический анализ показал, что в контрольной группе численная плотность митозов составила 5.6 ± 0.4 на тестовую площадь, а объемная плотность PCNA-положительных опухолевых клеток составила $62.7 \pm 3.8\%$ (Таблица 1). В группе, получавшей биназу в дозе 0.5 мг/кг, наблюдалось 5.1-кратное снижение численной плотности митозов и 2.9-кратное уменьшение объемной плотности PCNA-положительных клеток по сравнению с контролем (Таблица 1). Биназа в дозе 1 мг/кг не оказывала столь выраженных эффектов: количество митозов и PCNA-положительных клеток

уменьшилось всего в 1.8 и 1.4 раза по сравнению с контрольной группой, соответственно (Таблица 1). Введение биназы приводило к индукции апоптоза в опухолевой ткани, что выражалось в увеличении объемной плотности каспаза-7-положительных клеток в 3.4 - 4.9 и 3.4 раз по сравнению с контролем (Таблица 1).

Таблица 1. Влияние биназы на морфологическую организацию опухолевой ткани RLS₄₀

Морфологический параметр	С	Bi0.5	Bi1
Митотические клетки, Nv	5.6±0.4	1.1±0.3 ¹⁾	3.2±1 ¹⁾
PCNA-положительные клетки, Vv, %	62.7±3.8	21.4±2.3 ¹⁾	44.7±9.5 ¹⁾
Каспаза-7 положительные клетки, Nv	5.3±0.5	25.9±2.3 ¹⁾	17.8±3.5 ¹⁾

С (контроль) – мыши с RLS₄₀, получавшие инъекции физ./раствора, Bi0.5 и Bi1 – мыши с RLS₄₀, получавшие инъекции биназы в дозах 0.5 и 1 мг/кг, соответственно. ¹⁾ Отличия от контроля $p \leq 0.05$.

3. Поиск миРНК, чувствительных к биназе и РНКазе А, и их биоинформатический анализ

3.1. Изменение профиля миРНК в клетках RLS₄₀, В16 и HeLa под действием биназы и РНКазы А.

Было исследовано влияние биназы и РНКазы А на ряд миРНК в клетках различных опухолевых линий. Панель миРНК включала miR-21a, miR-10b, miR-145a, miR-31, let-7g и miR-155. Эти миРНК были выбраны согласно полученным ранее данным (Mironova et al., 2013). Клетки RLS₄₀ инкубировали в присутствии биназы в концентрациях 5 и 10 мкг/кг в течение 24 ч. Данные qПЦР показали, что биназа в концентрации 5 мкг/мл приводила к снижению уровней экспрессии miR-21a, let-7g, miR-31 и miR-155 в 1.6–2 раза; увеличение концентрации биназы до 10 мкг/мл не усиливало эффекта. Уровни miR-10b и miR-145a после обработки биназой не менялись.

Клетки В16 и HeLa инкубировали в присутствии РНКазы А (5 мкг/мл) в течение 48 ч. В клетках В16 РНКазы А приводила к снижению уровней экспрессии miR-10b и miR-155 в 1.1-2 раза, при этом уровни let-7g, miR-21a, miR-31 и miR-145a не менялись. В клетках HeLa под действием РНКазы А наблюдалось достоверное повышение уровней экспрессии let-7g, и miR-31.

3.2. Профиль миРНК опухолевой ткани и сыворотки крови мышей с RLS₄₀ обработанных биназой и профиль миРНК в легочной ткани и сыворотке крови мышей с меланомой В16, обработанных РНКазой А

Профили миРНК в опухолевой ткани и сыворотке крови мышей с RLS₄₀ после лечения биназой анализировали с помощью stem-loop RT-qПЦР. Как и ожидалось, введение мышам биназы приводило к снижению уровня miR-21a, miR-31, miR-145a и miR-10b в 2 – 6 раз (Рис. 9, А). Введение биназы мышам с RLS₄₀ приводило к возрастанию уровней пяти миРНК в опухолевой ткани: онкомиров miR-21, miR-10b, miR-31 и miR-155 и онкосупрессора let-7g (Рис. 9, Б). Эффекта от введения биназы на miR-145a обнаружено не было.

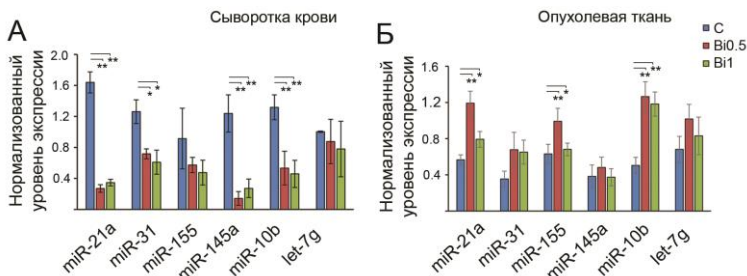


Рис. 9. Влияние биназы на уровень миРНК в сыворотке крови (А) и опухолевой ткани (Б) мышей с RLS₄₀. Данные ОТ-қПЦР. Мыши с RLS₄₀ получали в/б инъекции биназы в дозах 0.5 и 1 мг/кг три раза в неделю по схеме, приведенной на Рис. 8. Уровень экспрессии миРНК в тканях нормализовали на уровень экспрессии U6 мяРНК, в сыворотке крови – на объем сыворотки. С (контроль) – мыши с RLS₄₀, получавшие инъекции физ./раствора, Bi0.5 и Bi1 – мыши с RLS₄₀, получавшие инъекции биназы в дозах 0.5 и 1 мг/кг, соответственно. Данные анализировали с использованием ANOVA с критерием Тьюки и представляли как MEAN±SEM. **p* < 0.05.

Профили миРНК были проанализированы в метастатических очагах мышей с В16, получавших РНКазу А, прилегающей к ним нормальной ткани легких и сыворотке крови. В метастатических очагах исследуемые миРНК детектировались на уровне 0.4 – 1.5 за исключением let-7g, уровень которой был самым высоким и составил 4. Введение РНКазы А не приводило к достоверному изменению уровня исследуемых миРНК за исключением let-7g, уровень которой упал в 4 раза (Рис. 10, А).

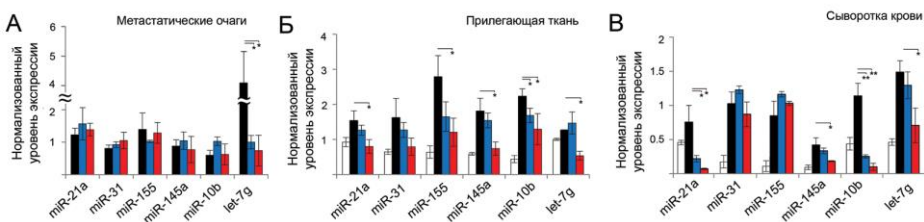


Рис. 10. Влияние РНКазы А на уровень миРНК в метастатических очагах (А), прилегающей к ним ткани (Б) и сыворотке крови (В) мышей с меланомой В16. Данные ОТ-қПЦР. Мыши с В16 получали в/м инъекции РНКазы А в дозах 0.7 и 7 мг/кг по схеме, приведенной на Рис. 5. Уровень экспрессии миРНК в тканях нормализовали на уровень экспрессии U6 мяРНК, в сыворотке крови – на объем сыворотки. Н – здоровые мыши, С (контроль) – мыши с В16, получавшие физ./раствор, 0.7R и 7R – мыши с В16, получавшие РНКазу А в дозах 0.7 и 7 мг/кг, соответственно. Данные анализировали с использованием ANOVA с критерием Тьюки и представляли как MEAN±SEM. **p* < 0.05; ***p* < 0.01.

Оказалось, что профиль миРНК в здоровой ткани и ткани, прилегающей к метастатическим очагам, существенно различается. Так, было показано, что в тканях, прилегающих к метастатическим очагам, наблюдается увеличение уровня 5 миРНК по сравнению со здоровыми тканями легких: miR-21a - в 1.5 раза, miR-

31 - в 2.4 раза, miR-155 - в 4 раза, miR-145a - в 2.8 раза, miR-10b – в 4.5-раза (Рис. 10, Б). Введение РНКазы А мышам с В16 (группы 0.7R и 7R) приводило к снижению уровня экспрессии miR-21a, miR-31, miR-145a, miR-155 и miR-10b по сравнению с контрольной группой (Рис. 10, Б). В группе 0.7R наблюдалось некоторое снижение уровня этих миРНК, тогда как в группе 7R снижение достигало уровня здоровых животных. Следует отметить, что в группе 7R наблюдалось существенное снижение уровня let-7g даже ниже уровня здоровых животных (Рис. 10, Б).

В сыворотке крови здоровых животных миРНК обнаруживались на уровне 0.2 – 0.4 (Рис. 10, В). Прогрессирование меланомы приводило к выраженному повышению уровня всех миРНК. При введении РНКазы А в дозе 0.7 мкг/кг выявлено достоверное снижение уровня miR-21a в 3.5 раза, miR-10b – в 4.5 раза, miR145a и let-7g - в 1.3 раза (Рис. 10, В). Повышение дозы РНКазы А до 7 мкг/кг приводило к снижению уровня miR-21a и miR-10b в 11 раз, miR-145a и let-7g в 2.1 – 2.3 раза, в то время как уровни miR-31 и miR-155 оставались неизменными (Рис. 10, В).

3.3. Исследование влияния РНКазы А на экспрессию маркеров ЕМТ в метастатических очагах и прилегающей ткани легких у мышей с меланомой В16

Для того чтобы оценить влияние РНКазы А на развитие метастазов была исследована экспрессия маркеров в метастатических очагах и прилегающих к ним тканях, связанных с эпителиально-мезенхимальным переходом (ЕМТ): Cdh1, Tjp1, Fn и Vim, играющих важную роль в инвазии и метастазировании. С помощью ОТ-qПЦР было проведено сравнение уровня экспрессии ЕМТ-маркеров в тканях, прилегающих к метастатическим очагам, с уровнем экспрессии в ткани легких здоровых животных, поскольку они имеют одно и то же происхождение (эпителиальное) в отличие от метастатических очагов, имеющих нейроэктодермальное происхождение.

В метастатических очагах уровень экспрессии Cdh1 составил 0.5, тогда как уровни экспрессии остальных ЕМТ-маркеров были около 1 (Рис. 11, А). Введение РНКазы А (группа 0.7R) вызывало повышение уровня экспрессии Cdh1 в 1.6 раз, при этом экспрессия Vim снижалась в 1.1 раз, а уровни экспрессии Tjp1 и Fn не изменялись (Рис. 11, А). Увеличение дозы РНКазы А до 7 мкг/кг (группа 7R) приводило к увеличению экспрессии Cdh1 в 2.4 раза, снижению экспрессии Vim и Tjp1 в 1.2 - 1.4 раза, тогда как уровень Fn остается неизменным (Рис. 11, А).

Легочная ткань, прилегающая к метастатическим очагам, характеризовалась достоверным снижением уровня Cdh1 в 3 раза относительно здорового контроля, повышением уровня экспрессии Tjp1 и Fn в 1.3 раза и снижением уровня экспрессии Vim в 1.5 раза (Рис. 11, Б). Введение РНКазы А (группа 0.7R) приводило к повышению экспрессии Cdh1 до уровня здоровых животных, повышению экспрессии Vim в 1.2 раза, при этом экспрессия Tjp1 и Fn не менялась (Рис. 11, Б). Увеличение дозы РНКазы А до 7 мкг/кг (группа 7R) не влияло на экспрессию Cdh1 (в пределах MEAN±SEM) и вызывало снижение

экспрессии Tjp1 и Fn ниже уровня здоровых животных. Так же, как и в группе 0.7R, в группе 7R экспрессия Vim незначительно увеличивалась и достигала уровня здоровых животных (Рис. 11, Б). Экспрессию E-кадгерина и виментина в метастатических очагах исследовали с помощью флуоресцентной иммуногистохимии. Как видно из представленных данных, метастатические очаги характеризуются низким уровнем экспрессии E-кадгерина и средним уровнем экспрессии виментина (Рис. 11, В). Введение РНКазы А мышам с В16 усиливало флуоресценцию E-кадгерина в очагах метастазов в легких: интенсивность флуоресценции увеличивалась в 2–2.3 раза в группах 0.7R и 7R по сравнению с контролем (Рис. 11, В). Одновременно с повышением экспрессии E-кадгерина наблюдалось снижение экспрессии виментина в 2.5-2.6 раз в метастатических очагах тех же групп по сравнению с контрольными животными (Рис. 11, В). Следует отметить, что влияние РНКазы А на экспрессию EMT-маркеров в метастатических очагах в дозе 0.7 мкг/кг были более выражены, чем в дозе 7 мкг/кг.

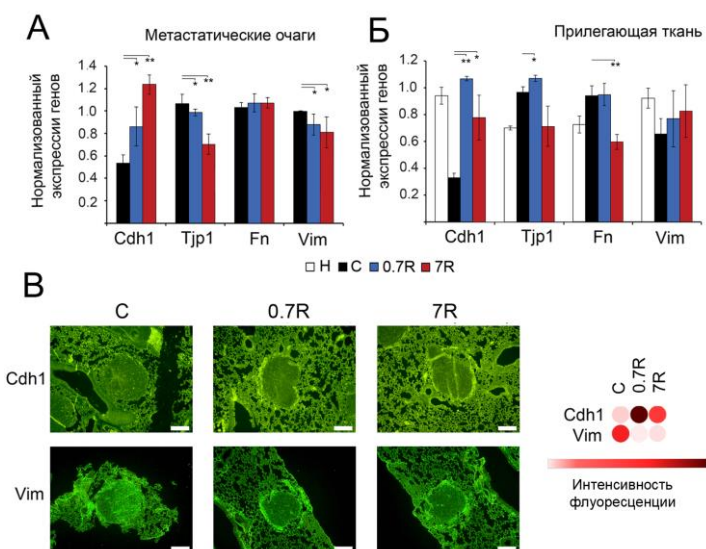


Рис. 11. Влияние РНКазы А на экспрессию EMT-ассоциированных маркеров в метастатических очагах и прилегающих к ним тканях у мышей с меланомой В16. **А** и **Б**. Уровень экспрессии генов Cdh1, Tjp1, Fn и Vim в метастатических очагах и прилегающих тканях легких мышей с меланомой В16, соответственно, получавших в/м РНКазу А в дозах 0.7 и 7 мкг/кг по схеме, приведенной на Рис. 5. Данные ОТ-кПЦР. Референсный ген - Hprt. **В**. Флуоресцентная визуализация E-кадгерина и виментина в легких мышей с В16. Срезы легких окрашивали anti-Cdh1 mAb и anti-Vim mAb и инкубировали с вторичными антителами с Alexa Fluor® 488. Увеличение $\times 200$. Н – здоровые мыши, С (контроль) – мыши с В16, получавшие инъекции физ./раствора, 0.7R и 7R – мыши с В16, получавшие инъекции РНКазы А в концентрациях 0.7 и 7 мкг/кг, соответственно. Данные анализировали с использованием t-теста Стьюдента и представляли как MEAN \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

3.4. Анализ сигнальных путей, контролируемых миРНК, чувствительными к биназе и РНКазой А

Одной из задач нашего исследования являлось выяснение того, какие биологические процессы и пути могут контролироваться миРНК, восприимчивыми биназе и РНКазе А, и может ли модулирующий эффект биназы и РНКазы на эти миРНК лежать в основе ее биологической активности. На рис. 13 приведена блок-схема, иллюстрирующая основные этапы анализа генов-мишеней миРНК, восприимчивых к РНКазе А и биназе. Гены-мишени миРНК, чувствительных к РНКазе А, были предсказаны с использованием четырех независимых баз данных миРНК miRmap, miRSystem, miRDB и miRWalk. Затем с помощью диаграммы Венна были идентифицированы перекрывающиеся гены, общие для всех анализируемых баз данных миРНК (Рис. 12). В случае биназы гены-мишени чувствительных к ней миРНК были проанализированы с использованием базы данных miRTarBase (Рис. 12). Регулум, содержащий либо РНКазу А-чувствительные миРНК и их гены-мишени, либо биназа-чувствительные миРНК и их гены-мишени, был реконструирован с помощью STRING (Рис. 13), с наложением полученных нами экспериментальных данных, что позволило рассматривать валидированные ранее сигнальные пути. Далее была проведена комплексная функциональная аннотация выявленных генов-мишеней с использованием баз данных GeneOntology, KEGG, REACTOME и WikiPathways (Рис. 12).

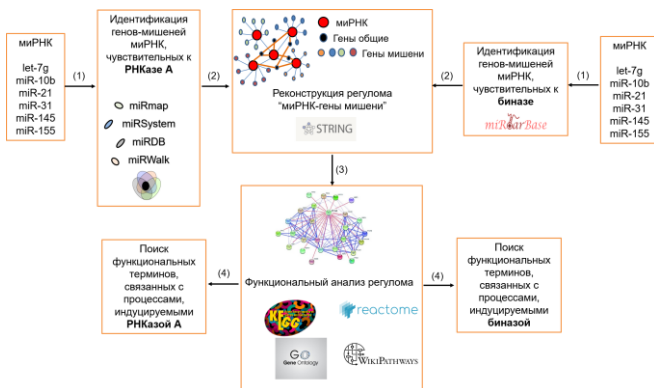


Рис. 12. Биоинформатический анализ. Блок-схема (флоучарт), иллюстрирующая основные этапы анализа генов-мишеней миРНК, восприимчивых к биназе и РНКазе А.

Было обнаружено, что большинство выявленных терминов связано с процессами, которые уже были идентифицированы, как чувствительные к действию биназы. Большое количество терминов, относящихся к апоптозу, жизнеспособности клеток и пролиферации опухолевых клеток, хорошо согласуется со способностью биназы запускать апоптоз в клетках RLS₄₀. Таким образом, биназа является модулятором сигнальных путей, связанных с дифференцировкой клеток и ангиогенезом (Рис. 13, А). Далее, для понимания внутриклеточных процессов, в регуляцию которых могут быть вовлечены выявленные гены-мишени миРНК-чувствительные к РНКазе А, был проведен их

функциональный анализ. Оказалось, что чувствительные к РНКазе А миРНК могут модулировать широкий спектр процессов и сигнальных путей, связанных с пролиферацией и подвижностью опухолевых клеток (Рис. 13, Б). Выяснилось, что большинство идентифицированных терминов связаны с процессами, которые уже были выявлены как чувствительные к РНКазе А: регуляция клеточной адгезии, морфогенез эпителия и организация межклеточных связей.

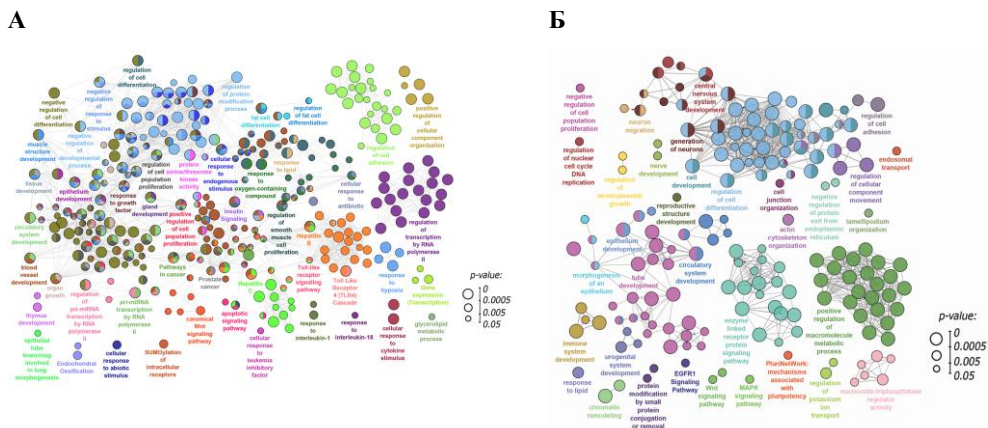


Рис. 13. Функциональная аннотация миРНК, чувствительных к биназе (А) и РНКазе А (Б). Сеть взаимодействия значимых терминов, обогащенная выявленными генами-мишенями миРНК. Функциональная аннотация была выполнена на ClueGO с использованием GeneOntology (биологические процессы), KEGG, REACTOME и Wikipathways. Функционально сгруппированная сеть была связана на основе показателей каппа терминов. В сеть были включены только термины / пути с $p < 0.05$ после поправки Бонферрони.

4. Заключение

На основании полученных данных была выдвинута гипотеза о потенциальном механизме противоопухолевого действия РНКазы А и биназы. Согласно этому механизму РНКазы А и биназа связываются с опухолевой клеткой, причем селективность их взаимодействия достигается за счет экспонирования на поверхности опухолевых клеток остатков гепарансульфата, хондроитинсульфата и сиаловой кислоты (Chao et al., 2010). В селективность биназы по отношению к опухолевым клеткам также вносит вклад экспрессии клетками ряда онкогенов (Mitkevich et al., 2013). Биназа проникает в цитозоль, где способна вызывать деградацию клеточной РНК, активацию Ca^{2+}/K^{+} каналов (Mitkevich et al., 2013) и запуск апоптоза. РНКазы А и биназа проникают в цитозоль, расщепляют внутриклеточные РНК с последующим изменением профиля миРНК. Параллельно с этим происходит деградация внеклеточных циркулирующих РНК, включая миРНК, что также оказывает регуляторное воздействие на опухолевые клетки.

Вследствие регуляторной реорганизации опухолевой клетки под действием биназы и РНКазы А, а также разрушения благоприятного опухолевого микроокружения вследствие изменения профиля ЕМТ-маркеров под действием РНКазы А, происходит подавление миграции и инвазии опухолевых клеток, активация адгезии, и, как следствие, снижение уровня метастазирования. Вследствие этого происходит подавление миграции опухолевых клеток, их гибель и, как следствие, ингибирование роста первичной опухоли и метастазирования.

5. Выводы

Данная работа представляет собой фундаментальное исследование, в ходе которого были выяснены молекулярные механизмы, опосредующие противоопухолевую активность бычьей панкреатической РНКазы А и микробной рибонуклеазы *B. pumilus* (биназы).

1. Впервые продемонстрировано, что РНКазы А после проникновения в клетки меланомы В16 мыши и эпидермоидной карциномы шейки матки HeLa человека частично остается не связанной с ингибитором рибонуклеаз, что приводит к снижению уровня внутриклеточных РНК в обоих типах клеток.

2. Показана способность РНКазы А ко-локализоваться с внутриклеточным гетеродимерным белком Ku70/Ku80, что может лежать в основе механизма проникновения РНКазы А в клетки и ее внутриклеточного транспорта.

3. Показано, что РНКазы А подавляет миграцию и инвазию ряда опухолевых клеток *in vitro*, но не влияет на их жизнеспособность. Биназа снижает жизнеспособность опухолевых клеток за счет индукции апоптоза и подавляет их миграцию.

4. Показано, что РНКазы А подавляет метастазирование в легкие мышей с метастатической меланомой В16, меняет профиль миРНК и экспрессию ЕМТ-маркеров в ткани, прилегающей к очагам метастазирования, разрушая формирование благоприятного микроокружения опухоли.

5. Показано, что биназа замедляет рост первичной лекарственно-устойчивой лимфосаркомы RLS₄₀, подавляет развитие метастазов в печени и меняет профиль миРНК в опухолевой ткани, что сопровождается снижением в ней пролиферативного потенциала.

6. С помощью биоинформатического анализа с наложением экспериментальных данных проведена функциональная аннотация генов-мишеней миРНК, чувствительных к РНКазе А и биназе. Показано:

- Основными биологическими процессами, модулируемыми миРНК, чувствительными к РНКазе А, в микроокружении опухоли являются регуляция клеточной адгезии, а также сигнальные пути, связанные с эпителиально-мезенхимальным переходом.

- Основными событиями, модулируемыми миРНК, чувствительными к биназе, в опухолевой ткани являются пролиферация, апоптоз, миграция и сигнальные пути, связанные с опухолевой прогрессией.

Результаты диссертации опубликованы в работах:

1. Зеленихин П.В., Мохамед И.С., Надырова А.И., Сироткина А.А., Ульянова В.В., Миронова Н.Л., Миткевич В.А., Макаров А.А., Зенкова М.А., Ильинская О.Н. Рибонуклеаза *Bacillus pumilus* ингибирует миграцию клеток аденокарциномы двенадцатиперстной кишки человека HuTu 80 // Молекулярная биология. – 2020. – Т. 54. – С. 146 – 152.
2. Mohamed I.S.E., Sen'kova A.V., Nadyrova A.I., Savin I.A., Markov A.V., Mitkevich V.A., Makarov A.A., Pinskaya O.N., Mironova N.L., Zenkova M.A. Antitumour activity of the ribonuclease binase from *Bacillus pumilus* in the RLS₄₀ tumour model is associated with the reorganisation of the miRNA network and reversion of cancer-related cascades to normal functioning // Biomolecules. – 2020. – V. 10. – P. 1509.
3. Mohamed I.S.E., Sen'kova A.V., Markov O.V., Savin I.A., Markov A.V., Zenkova M.A., Mironova N.L. Bovine pancreatic RNase A: insight in to the mechanism of antitumor activity *in vitro* and *in vivo* // Parmaceutics. – 2022. – V. 14. – P. 1173.

Работа была выполнена при поддержке грантом КОМФИ 17-00-00059.

Подписано в печать 03.06.2022. Печать офсетная.
Бумага офсетная. Формат 60x84 1/16. Усл. печ. 2 л.
Тираж 150 экз. Заказ №

Отпечатано в типографии «АЛЕКСПРЕС»
ИП Малыгин Алексей Михайлович
630090, Новосибирск, пр-т академика Лаврентьева, 6/1, оф. 104
Тел. (383) 217-43-46, 8-913-922-19-07