

УДК 577.21

СПЕЦИФИЧНОСТЬ АПТАМЕРОВ U2 И GOL1 К EGFR – ПОЗИТИВНЫМ КЛЕТКАМ ГЛИОБЛАСТОМЫ ЧЕЛОВЕКА *IN VITRO*

© 2024 г. Ф. М. Дзариева^{1,*}, Д. В. Шамадыкова¹, О. В. Случанко², С. А. Павлова¹,
Л. В. Фаб¹, А. В. Рябова³, Д. Ю. Пантелеев¹, А. М. Копылов⁴, Д. Ю. Усачев⁵, А. В. Головин^{4, 6},
Г. В. Павлова^{1, 5, 6, **}

¹ФГБУН «Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии Российской академии наук», Москва, Россия

²ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н. И. Пирогова» Минздрава России, Москва, Россия

³ФГБУН ФИЦ «Институт общей физики им. А. М. Прохорова РАН», Москва, Россия

⁴ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова», Москва, Россия

⁵ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр нейрохирургии им. академика Н. Н. Бурденко» Минздрава России, Москва, Россия

⁶ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова» Минздрава России, Москва, Россия

*e-mail: dz.fatima@mail.ru,

**e-mail: lkorochkin@mail.ru

Поступила в редакцию 04.09.2023 г.

После доработки 13.11.2023 г.

Принята к публикации 01.12.2023 г.

Гиперэкспрессия рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) или его мутации опосредуют сигнальные пути, приводящие к пролиферации, инвазии опухолевых клеток, а также к повышению их выживаемости. Несмотря на успешность клинического применения антител против EGFR у пациентов с колоректальным раком и плоскоклеточным раком головы и шеи, показана их низкая эффективность при глиобластоме. Поэтому для терапии глиом необходим специфичный к EGFR препарат, способный проникнуть в опухолевый очаг в головном мозге и обладающий низкой иммуногенностью. В данной работе в качестве такого препарата представлены аптамеры – одноцепочечные ДНК-олигонуклеотиды, специфичные к EGFR, U2 и Gol1. В этом исследовании мы получили клеточную модель глиомы человека с гиперэкспрессией EGFR и EGFRvIII, на которой показали специфичность аптамеров U2 и Gol1 к данным рецепторам, используя классические методы, а также метод апта-иммуноцитохимии. Исследование влияния связывания аптамера Gol1 с рецептором EGFRvIII на следующие ступени сигнального пути показало изменение уровней экспрессии генов, связанных с пролиферацией и выживаемостью клеток (*JUN*, *FOS*, *CCND1*, *PI3K* и *AKT3*), в то время как аптамер U2 не продемонстрировал значимый эффект на клетках *in vitro*. Эти результаты показали, что аптамер Gol1 обладает терапевтическим потенциалом против опухолевых клеток глиобластомы человека, гиперэкспрессирующих рецептор мутантного типа EGFRvIII.

Ключевые слова: EGFR, EGFRvIII, глиобластома, аптамер, клеточная модель глиомы, апта-иммуноцитохимия

DOI: 10.31857/S0044467724010097

ВВЕДЕНИЕ

Злокачественные новообразования являются одной из острейших проблем современной медицины. В России в 2021 г. они явились второй причиной смерти после патологий сердечно-сосудистой системы (Каприн, 2022). Глиомы же, как наиболее часто встречаемые опухоли головного мозга, остаются серьезной проблемой для человечества, несмотря на развитие технологий и медицины. Их особенности, такие как наличие гематоэнцефалического барьера, иммунное микроокружение и то-

пология, представляют ряд трудностей для терапии. EGFR на сегодняшний день является одной из наиболее перспективных мишеней терапии, поскольку наблюдается его гиперэкспрессия более чем в 60% глиом (Zhou et al., 2017).

Во многих глиомах выявляются разные изменения EGFR, в частности метилирование, амплификации, делеции и однонуклеотидные полиморфизмы (SNP). Эти изменения коррелируют с пролиферацией, инвазией опухоле-

вых клеток и с патологическим ангиогенезом. Также мутации данного гена коррелируют с выживаемостью пациентов и ответом на терапию ингибиторами тирозинкиназ (Wan et al., 2010). Глиобластома (ГБ) — наиболее агрессивная форма глиом (Grade IV), более 60% ГБ гиперэкспрессируют EGFR, и примерно в половине из них гиперэкспрессия EGFR является результатом мутантной формы рецептора, EGFRvIII (Zhou et al., 2017). В EGFRvIII происходит внутрирамочная делеция экзонов 2–7 (NM_001346941.2), что приводит к гиперэкспрессии укороченного рецептора. Этот прототип онкопротеина не связывается с лигандом и конститутивно активен (Zok et al., 2018). По сравнению с EGFRwt, в EGFRvIII отсутствуют аминокислоты 6–273, и удаление этих 268 аминокислот создает сайт соединения с новым остатком глицина между аминокислотами 5 и 274 (Babic et al., 2013).

EGFRvIII увеличивает экспрессию белков, важных для апоптоза, инвазии, стволовости, метаболизма и ангиогенеза, включая BCL-xL, белки внеклеточного матрикса (ECM), аномальный веретенообразный белок, ассоциированный с микроцефалией (ASPM), белок-переносчик глюкозы типа 1 (GLUT1), фактор, ингибирующий лейкемию (LIF) и фактор сплайсинга гетерогенного ядерного рибонуклеопротеина A1 (hnRNPA1) (Feng et al., 2012; Oprita et al., 2021; Reuter, Mathews, 2010; Ward et al., 2012; Xia et al., 2009). Эти факторы способствуют пролиферации и выживанию.

Редкие клетки в ГБ человека совместно экспрессируют EGFR и EGFRvIII, при этом коэкспрессия EGFR и EGFRvIII делает новообразования более злокачественными. Большинство опухолей глиобластомы человека, в которых показана совместная экспрессия EGFR и EGFRvIII, представлены гетерогенными опухолевыми клетками, часть из которых экспрессируют преимущественно один из вариантов рецептора. При этом клетки, экспрессирующие EGFRvIII, могут передавать сигналы клеткам, экспрессирующим только EGFR, паракринным образом. Показана возможная модель, включающая эти функции (Cvrljevic et al., 2011).

Воздействие на столь важную терапевтическую мишень в клетках глиомы, как EGFR, влечет за собой ряд трудностей и неразрешенных вопросов. Препараты моноклональных антител, которые чаще всего используются в ме-

дицине для ингибирования EGFR, показывают крайне низкую эффективность при глиоме. Это связано с трудностями их доставки в опухолевую ткань, находящуюся в головном мозге. Аптамеры, или малые ДНК (или РНК), — аналоги химических антител, за счет уникальных третичных структур обладают высоким сродством и специфичностью к белкам-мишеням. Аптамеры отбирают путем систематической эволюции лигандов при помощи экспоненциального обогащения (SELEX) и разрабатываются в том числе как антагонисты факторов, ассоциированных с различными заболеваниями (Mayer & Arteaga, 2016). Они обладают рядом привлекательных черт в качестве молекулярных зондов, в сравнении с антителами: (1) низкая молекулярная масса; (2) низкая иммуногенность и токсичность; (3) высокая аффинность и специфичность; (4) быстрый, воспроизводимый синтез и модификация (Horvath et al., 2006; Ratushny et al., 2009).

В случае аптамеров, специфичных к маркерам злокачественных образований, один из приоритетных объектов — это маркер EGFR. На сегодняшний день известно более 30 аптамеров нуклеиновых кислот к EGFR (Kopylov et al., 2021). Эти «химические малые нуклеиновые антитела» рассматриваются как крайне перспективные соединения, способные специфически связываться с EGFR и его мутантной формой EGFRvIII и, возможно, даже оказывать на них определенное воздействие, а также осуществлять опосредованную доставку препаратов в клетки. Два аптамера в более ранних исследованиях показали интересные антипролиферативные свойства для глиом человека: аптамер U2 (Mayer & Arteaga, 2016) и полученный в результате укорачивания U2 с сохранением специфичных структур для связывания с EGFR — Goll.

В данной работе была создана клеточная модель глиомы человека с гиперэкспрессией EGFR и EGFRvIII с последующей оценкой специфичности аптамеров U2 и Goll к данным рецепторам. Для сравнения в качестве «золотого» стандарта была принята клеточная линия U87, а также использована клеточная культура глиобластомы человека G01, полученная из опухолевой ткани пациента (Pavlova et al., 2021). В ходе работы необходимо было понять роль U2 и Goll в изменении экспрессии генов молекул сигнальных путей EGFR, приводящих к росту и делению клеток, пролиферации и выживаемости опухолевых клеток глиобластомы человека.

МЕТОДИКА

*Клеточные культуры и клеточные линии
глиобластомы человека*

Линия клеток U87 была получена из Института цитологии РАН (Санкт-Петербург). Первичная культура клеток глиобластомы человека G01 была получена из эксплантата, предоставленного НМИЦ нейрохирургии им. академика Н. Н. Бурденко (Москва).

U87/EGFRwt, G01/EGFRwt и G01/EGFRvIII были получены в результате трансфекции генетическими конструкциями при использовании реагента TurboFect (ThermoFisher Scientific, США). Селекция проводилась с использованием антибиотика гигромицина В (ThermoFisher Scientific, США) в концентрации 200 мкг/мл. Для контроля уровня трансфекции клеток проводили трансфекцию клеток плазмидой pEGFP-N1 (Clontech, США), содержащей ген GFP (зеленый флуоресцентный белок), после которой было подсчитано соотношение клеток с флуоресцентным зеленым свечением к ядрам клеток. Результаты были оценены при помощи флуоресцентного микроскопа KEYENCE BZ-9000.

Трансфицированные и нетрансфицированные клетки U87 и G01 пассировали в культуральной среде DMEM/F12 (ПанЭко, Россия) с добавлением L-глутамина (ПанЭко, Россия) в концентрации 292 мг/л, 10% фетальной бычьей сыворотки (Thermo Fisher Scientific, США) и 100-кратного антибиотика-антимикотика (10000 единиц / мл пенициллина, 10000 мкг / мл стрептомицина и 25 мкг / мл Gibco Amphotericin B) при 37 °C и 5% CO₂. Трансфицированные клетки культивировали до получения трансгенных культур с устойчивой экспрессией EGFR или EGFRvIII.

Аптамеры

Поиск новой последовательности ДНК, способной связываться с EGFR, опирался на предположение об оптимизации вторичной структуры известных аптамеров. В качестве источника данных о вторичной структуре использовали предсказанные состояния для ДНК-аптамера U2, который был отобран командой X. Zhang (Wu et al., 2014). На основании анализа вариантов предсказанных структур двух разных аптамеров U2 и U31, специфичных к EGFR и EGFRvIII, был выбран дизайн новой структуры, содержащий мультипетлю. Предполагалось, что именно мультипетля служит узнающим элементом.

По результатам вычислительной оптимизации последовательности под желаемую вторичную структуру методом многомерного сканирования Больцмана в утилите RNASketch (Hammer et al., 2017, 2019) был предложен аптамер Gol1 с последовательностью: 5'-GCCGGCATTTTGACGCCGCCCCGGCTGCTTATGCTCCGGGGGCATATGGC-3'.

Антитела

В исследовании были использованы антитела против EGFR «дикого типа» EGFR (225) (# MA5-12880 ThermoFisher Scientific, США), антитела против мутантной формы EGFRvIII (L8A4) (MABC1126-100UG Merck, Германия), антитела против бета-тубулина (T7816) (Sigma, США), вторичные ослиные антимышиные антитела, меченые HRP (115-035-003 Jackson ImmunoResearch, Англия), вторичные ослиные антимышиные антитела, конъюгированные с флуоресцентным красителем Cy5 (715-175-151 Jackson ImmunoResearch, Англия).

Клонирование

В результате клонирования была получена генно-инженерная конструкция *EGFRvIII/CMV3*, основанная на экспрессионном векторе *CMV3-untagged* (Sinobiological, США), предназначенном для гиперэкспрессии в клетках млекопитающих. *EGFRvIII* был получен в результате инвертированного ПЦР на основе коммерческого вектора pCMV-EGFR (кат. номер HG10001-UT, Sinobiological, США), который содержит кодирующую последовательность «дикого типа» EGFR, вектор *EGFRwt/CMV3*. Для инвертированного ПЦР дополнительно создали конструкцию на основе вектора *pBluescript II SK(+)* (*pBSK II SK(+)*) (Stratagene, США): *EGFRwt* был вырезан эндонуклеазами рестрикции Kpn1 и Xba1 и лигирован в *pBSK II SK(+)*, обработанный этими же рестриктазами. В результате инвертированного ПЦР была получена делеция в 801 пн, что соответствует делеции 2–7 экзона дикого типа *EGFR*. Параметры ПЦР-реакции для Phusion-полимеразы (ThermoFisher Scientific, США): предварительная денатурация 98°C 4 мин; денатурация 98°C 15 сек, отжиг 60°C 15 сек, элонгация 90 сек, 35 циклов; финальная элонгация 72°C 5 мин. Нуклеотидная последовательность праймеров: *EGFRvIII_F0* CGG GCT CTG GAG GAA AAG AA; *EGFRvIII_R0* GAG GGA GCG TAA TCC CAA GG; *EGFRvIIIinvF* GTA ATT ATG TGG TGA CAG A; *EGFRvIIIinvR* CTT TCT TTT CCT CCA GAG C.

Вестерн-блот-гибридизация

Клетки лизированы в SDS–Лэммли-буфере (62.5 мМ Tris–HCl (pH 6.8), 2% SDS и 10% глицерол, 100 мМ дитиотреитол). Нормализованное количество клеток образцов было разделено в 8.0%-м SDS-полиакриламидном геле, проведен перенос на нитроцеллюлозную мембрану 0.22 мкрн (BioRad, США) при 100 В в течение 1 ч при охлаждении. Для иммуноблоттинга использовали антитела против EGFR (225) (1:750), антитела против EGFRvIII (L8A4) (1:1000), антитела к бета-тубулину (T7816) (1:700), вторичные антитела, меченные HRP (1:20000).

Апта-иммуноцитохимия

Клетки предварительно инкубировали на круглых покровных стеклах, помещенных в лунки 24-луночного планшета, в течение 3 ч в присутствии аптамеров U2 и Goll в концентрации 1 мкМ и полной ростовой среды DMEM/F12. После этого отмытые 3 раза по 5 мин фосфатно-солевым буфером клетки фиксировали 4%-м параформальдегидом в течение 30 мин при +4°C для дальнейшего иммуноцитохимического анализа. Препараты клеток инкубировали в течение часа при комнатной температуре с первичными антителами против EGFR (225) и против EGFRvIII (L8A4) в титре 1:50, затем проводили инкубацию в темноте со вторичными антимышиными мечеными Cy5 антителами (1:50). Ядра клеток окрашивали Hoechst 33342 (1:500) (Sigma).

Препараты исследовали на комплексе лазерного сканирующего конфокального микроскопа Carl Zeiss серии LSM-710 с короткоимпульсным

фемтосекундным инфракрасным лазером с перестраиваемым диапазоном (800–1500 нм) для мультифотонного возбуждения флуоресценции.

Проточная цитометрия

Клетки U87, G01, U87/EGFRwt, G01/EGFRwt и G01/EGFRvIII плотностью 5×10^5 были диссоциированы и осаждены центрифугированием 5 мин при 1000 g. Промытый фосфатно-солевым буфером осадок клеток разделили на 3 пробирки: контроль, клетки с добавлением U2, клетки с добавлением Goll. Инкубацию клеток с аптамерами, мечеными FAM, в концентрации 1000 наномоль проводили в течение 30 мин при +4°C в темноте. Далее клетки трижды промывали фосфатно-солевым буфером путем осаждения в течение 3 мин при 1000 g и последующего ресуспендирования в буферном растворе, ресуспендировали в 200 мкл буферного раствора и проводили измерение на приборе. Интенсивность флуоресценции определяли путем подсчета 10000 событий на проточном цитометре CytoFLEX LX и ПО CytExpert (Beckman Coulter, США).

Оценка уровня экспрессии белков сигнального пути EGFR методом полимеразной цепной реакции в реальном времени

При достижении конfluenceности 70% к клеточным культурам добавляли аптамер U2 или Goll в концентрации 10 мкМ, в качестве отрицательного контроля были приняты клетки без воздействия. Спустя 72 ч из клеток выделяли тотальную РНК с помощью реагента RNazol® RT (Sigma, США), в соответствии с протоко-

Таблица 1. Последовательность олигонуклеотидных праймеров
Table 1. Sequence of oligonucleotide primers

Ген	Прямой праймер 5'-3'	Обратный праймер 5'-3'
<i>Grb2</i>	GGCGTTCTCCTGCTTGACT	ATGACTTCCTCCTCCGCTCT
<i>SOS</i>	GCAGCTGCCCTACGAGTTT	GGCTGAGCTTGGCATAGCA
<i>Ras</i>	AGCAGATCAAACGGGTGAAGG	TCTTGGCCGAGGTCTCGAT
<i>A-RAF</i>	CAAGGGACGAAAGACGGTCA	CAAGGGACGAAAGACGGTCA
<i>MEK</i>	TCTGCAGTTAACGGGACCAG-	GGCTTGTGGGAGACCTTGAA
<i>ERK</i>	CCAGAGAACCCTGAGGGAGA	TGTTGAGCAGCAGGTTGGAA
<i>PI3K</i>	CTGCAGTTCAACAGCCACAC	TGTGCATTCTTGGGCTCCTT
<i>AKT3</i>	CCATTGTGAAAGAAGTTGGGT	TGCCACTGAAAAGTTGTTGAGG
<i>JUN</i>	GGATCAAGGCGGAGAGGAAG	GCTGCGTTAGCATGAGTTGG
<i>c-Fos</i>	CAAGCGGAGACAGACCAACT	TGCTGCTGATGCTCTTGACA
<i>Cyclin D1</i>	GGCGGAGGAGAACAAACAGA	TGTGAGGCGGTAGTAGGACA
<i>CDK4</i>	GCCAGTGGCTGAAATTGGTG	CAGTCGCCTCAGTAAAGCCA
<i>RPL13A</i>	CATAGGAAGCTGGGAGCAAG	GCCCTCCAATCAGTCTTCTG
<i>GAPDH</i>	CAGGGCTGCCTTCTTGTG	GCCTTGACTGTGCCGTTGAA
<i>TBP</i>	GAGCTGTGATGTGAAGTTTCC	TCTGGGTTTGATCATTTCTGTAG

лом производителя. Для получения кДНК использовали обратную транскриптазу MMLV H minus (Thermo Fischer, США) и рандомный N10-праймер (Евроген, Россия). Полученную кДНК использовали для проведения полимеразной цепной реакции. Параметры ПЦР-РВ: предварительная денатурация – 95°C 5 мин; 40 циклов амплификации: 10 сек денатурации при 95°C; 30 сек – отжиг праймеров при 60°C; 30 сек элонгации при 72°C; финальная элонгация – 72°C 3 мин. Анализ проводился при помощи амплификатора LightCycler 96 и программного обеспечения LightCycler 96 Software Version 1.1 (ROCHE, Швейцария).

Праймеры подбирали к генам человека, используя программу Primer-Blast (NCBI). В качестве референсных генов были выбраны GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase),

RPL13A (ribosomal protein L13a). Целевые гены были выбраны из сигнального пути EGFR. Эксперимент проводился в трех повторностях.

Праймеры, которые использовали в исследовании, представлены в табл. 1.

Статистический анализ

Статистический анализ проводили двухфакторным дисперсионным анализом (two-way ANOVA) с последующим апостериорным тестом Тьюки или U-тестом Манна – Уитни с помощью GraphPad Prism 9.0.0 (GraphPad Software, Бостон, Массачусетс, США). Данные выражали как среднее значение $\pm$ стандартная ошибка среднего, р-критерий считался значимым при * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$, **** = $p < 0.0001$. Все эксперименты проводились в трех повторностях.

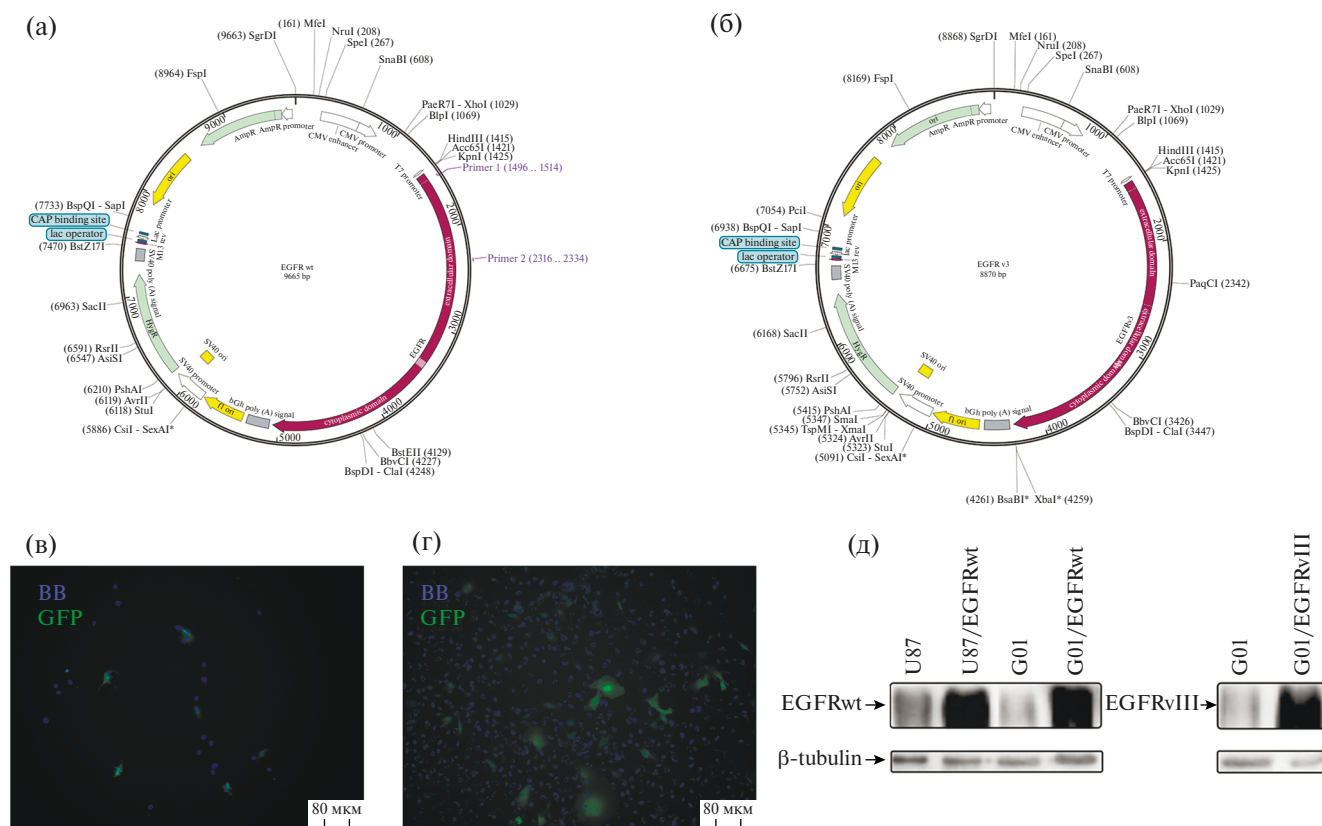


Рис. 1. (а) – карта молекулярно-генетической конструкции *EGFRwt/CMV3*; (б) – карта молекулярно-генетической конструкции *EGFRvIII/CMV3*; оценка эффективности трансфекции клеточной культуры G01 (в) и клеточной линии U87 (г), GFP – зеленое свечение. Ядра клеток окрашивали бисбензимином (Hoechst 33342, Sigma) – синее свечение. (д) – анализ экспрессии EGFR в контрольных и трансгенных клетках линии U87 и в клетках культуры G01, полученной от пациента. Нормализовано по бета-тубулину.

Fig. 1. (а) – Plasmid map of the vector *EGFRwt/CMV3*; (б) – Plasmid map of the vector *EGFRvIII/CMV3*; Evaluation of the efficiency of transfection of G01 (v) cell culture and U87 (r) cell line by human glioblastoma, GFP – green. The cell nuclei were stained with bisbenzimidazole (Hoechst 33342, Sigma) – blue. (д) – Analysis of EGFR expression in control and transgenic cells of the human glioblastoma cell line U87 and in patient-derived human glioblastoma G01 cultured cells. Normalised for beta-tubulin.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Получение трансгенных клеточных культур U87/EGFRwt, G01/EGFRwt и G01/EGFRvIII

Полученные в результате клонирования генно-инженерные конструкции *EGFRvIII/CMV3* и *EGFRwt/CMV3* использовали для трансфекции клеточной линии глиобластомы человека U87 и первично-перевиваемой культуры клеток глиобластомы человека G01 с последующим выведением стабильно-трансгенных культур клеток с гиперэкспрессией EGFRwt или EGFRvIII (рис. 1 (а) и 1 (б)).

Оценка уровня трансфекции клеточных линии и культуры показала, что процент трансфекции у клеток G01 составил 8.125%, у клеток U87 – 21.21% (рис. 1 (в) и 1 (г)). Клетки U87/EGFRvIII после трансфекции продемонстрировали крайне низкую выживаемость, и, так как не было по-

лучено достаточного количества для дальнейших исследований, данная линия исключена из экспериментов. Эксперимент повторялся более трех раз с повторяющимся эффектом – нежизнеспособной трансгенной клеточной линии. Таким образом, для дальнейшего исследования были получены стабильные трансгенные линии культур U87/EGFRwt и культуры G01/EGFRwt и G01/EGFRvIII.

Подтверждение экспрессии EGFRwt или EGFRvIII в трансгенных клеточных культурах глиобластомы человека методом Вестерн-блот-гибридизации

Созданные трансгенные клеточные культуры U87/EGFRwt, G01/EGFRwt и G01/EGFRvIII были проанализированы на наличие трансгенного белкового продукта (рис. 1 Д). Наибольший уровень экспрессии белкового продукта наблюдается в трансгенных клетках U87wt, G01vIII.

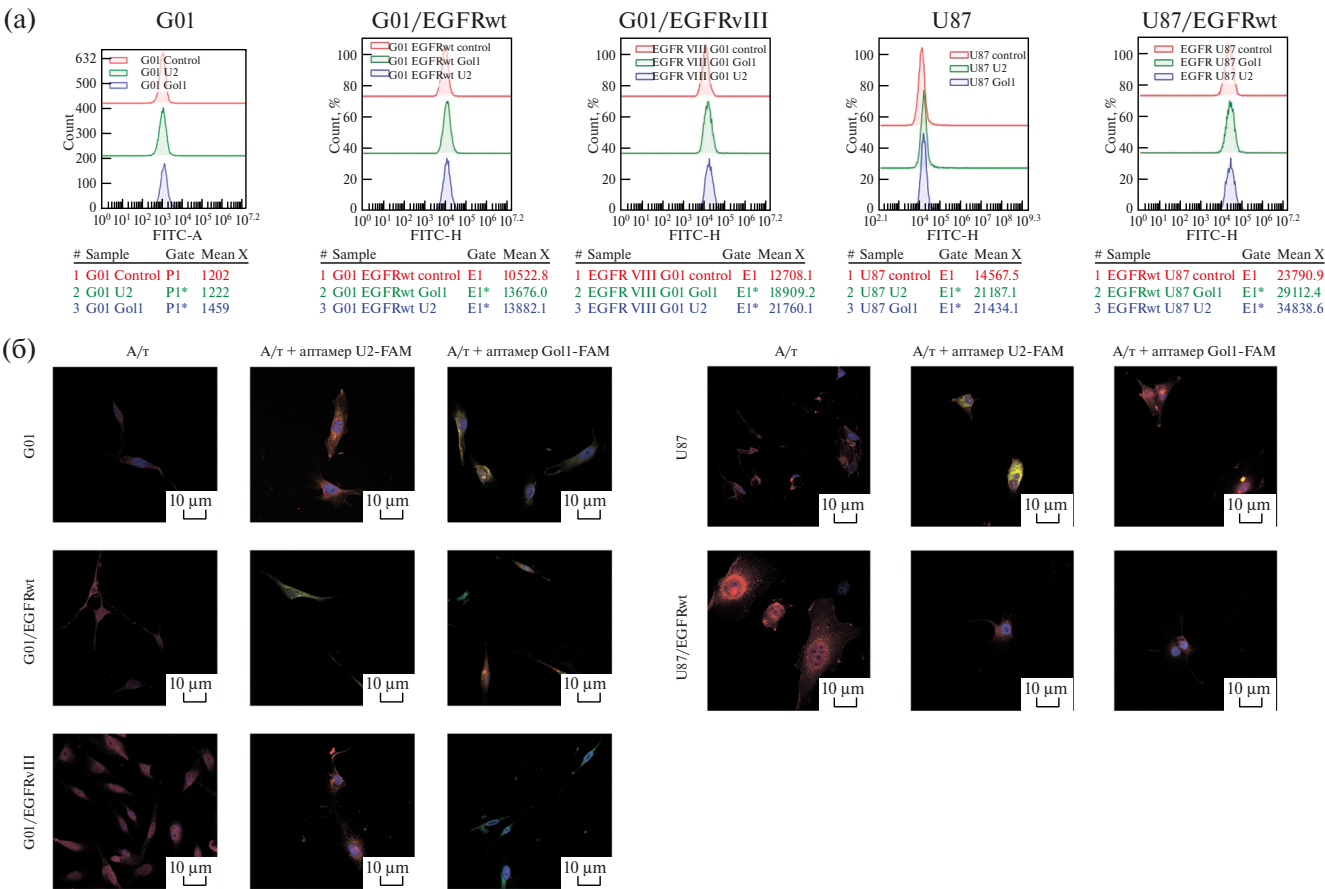


Рис. 2. Анализ связывания клеток глиобластомы человека *in vitro* с мечеными аптамерами U2-FAM и Gol1-FAM, специфичными к EGFR, методом проточной цитофлуориметрии (а) и апта-иммуноцитохимии (б). В качестве контроля взяты интактные клетки. Антитела против EGFR (красный), аптамеры U2 и Gol1 (зеленый), синий – окраска ядер бисбензимином.

Fig. 2. Analysis of binding of human glioblastoma cells *in vitro* with labeled aptamers U2-FAM and Gol1-FAM, specific for EGFR, by flow cytometry (a) and aptaimmunocytochemistry (b). Intact cells were taken as a control. Antibodies against EGFR (red), aptamers U2 and Gol1 (green), blue – staining of nuclei with bisbenzimidide.

Таблица 2. Цифровые показатели проточной цитофлуориметрии взаимодействия аптамеров U2 и Gol1 с клетками глиобластомы человека G01 и U87**Table 2.** Digital indicators of flow cytometry of interaction of U2 and Gol1 aptamers with human glioblastoma cells G01 and U87

	Среднее значение интенсивности флуоресценции клеток (контроль)	Среднее значение интенсивности флуоресценции клеток (связывание с аптамером U2)	Среднее значение интенсивности флуоресценции клеток (связывание с аптамером Gol1)
G01	1202	1222	1459
G01/EGFRwt	10522	13882	13676
G01/EGFRvIII	12708	21760	18909
U87	14567	21187	21434
U87/EGFRwt	23790	34838	29112

U2 и Gol1 специфично связываются с клетками U87/EGFRwt, G01/EGFRwt и G01/EGFRvIII

Оценка уровня интенсивности флуоресценции клеток методом проточной цитофлуориметрии после инкубации с аптамерами U2 и Gol1, меченными FAM (амидитом, содержащим флуоресцеин), показала окрашивание аптамерами целевых клеток (рис. 2 (а)). Клетки U87/EGFRwt, G01/EGFRwt и G-01/EGFRvIII продемонстрировали наилучшее связывание с U2 (рис. 2 (а)). В целом, полученные результаты проточной цитометрии позволяют утверждать, что выбранные нами аптамеры U2 и Gol1 специфичны к высоко экспрессирующим EGFR клеткам (табл. 2).

Если проанализировать взаимодействие аптамеров U2 и Gol1, специфичных к EGFR, с клетками культуры глиобластомы человека G01, то совершенно очевидно, что оба аптамера показывают большее сродство именно с EGFRvIII, что показывает привлекательность данных аптамеров для прогнозирования течения заболевания, а также возможность использовать их для доставки терапевтических агентов. Следует также обратить внимание: в случае взаимодействия с линейными трансгенными клетками U87/EGFRwt мы обнаруживаем высокое сродство к дикой форме. К сожалению, в данном случае мы не можем сравнить с мутантной формой U87/EGFRvIII, так как данную трансгенную линию не удалось вывести для анализа.

Апта-иммуноцитохимический анализ с использованием флуоресцентно-меченых аптамеров U2-FAM и Gol1-FAM, специфично связывающихся с EGFR

Для цитологической оценки экспрессии клетками был проведен иммуноцитохимический анализ в модифицированном варианте — апта-иммуноцитохимия (использовалась конкурентная окраска опухолевых клеток антителами

и аптамерами, специфичными к EGFR). Предварительная инкубация в течение 3 ч трансгенных клеточных культур глиобластомы человека G01 и трансгенной клеточной линии U87 глиобластомы человека с аптамерами U2 и Gol1 с последующим иммуноцитохимическим анализом позволила получить одновременную окраску клеток как аптамерами, так и антителами против EGFRwt и EGFRvIII.

Анализ результатов окрашивания антителами показал, что EGFR в исследуемых препаратах локализуется по всей цитоплазме клеток, в некоторых случаях по ядерной мембране (рис. 2 (б)). Аптамеры имеют ту же локализацию и полностью накладываются на окраску антителами, что подтверждает их специфичность к интересующему рецептору.

Стоит отметить более яркое свечение антител и аптамеров в трансгенных клетках U87/EGFRwt и G01/EGFRvIII, что говорит о большем количестве искомого рецептора, нежели в контрольных клетках (рис. 2 (б)). Результаты совпадают с данными Вестерн-блоттинга.

Кроме того, привлекает внимание тот факт, что воздействие аптамера Gol1 блокировало дальнейшую окраску антителами против EGFRvIII (рис. 2 (б)), что говорит о совпадении специфического эпитопа для связывания антитела и аптамера Gol1 и о конкурентном их связывании.

При наложении зеленого свечения аптамеров на красный свет флуоресцирующих антител против EGFR наблюдается оранжевое свечение. Оранжевое свечение говорит о взаимодействии аптамера и антитела с разными эпитопами EGFR, которое не создает конкуренции. В то же время совпадение распределения свечения антитела и аптамера говорит о совпадении мишени

EGFR. Наличие только зеленого свечения аптамера говорит о полном совпадении специфического эпитопа EGFR, связывание с которым аптамера не позволяет ему уже связаться с антителом.

По результатам апта-иммуноцитохимического анализа можно сказать, что U2 более специфичен к эпитопу EGFR дикого типа (EGFRwt), а Gol1 более специфичен к EGFRvIII.

Изменение уровней экспрессии белков сигнального пути EGFR после воздействия аптамеров U2 и Gol1 в клетках глиобластомы U87 и G01

Воздействие аптамеров U2 и Gol1 на клетки глиобластомы человека, гиперэкспрессирующие EGFRwt или EGFRvIII, оценивали методом полимеразной цепной реакции в реальном времени. Для панели были взяты гены основных молекул сигнальных путей EGFR, приводящих к росту,

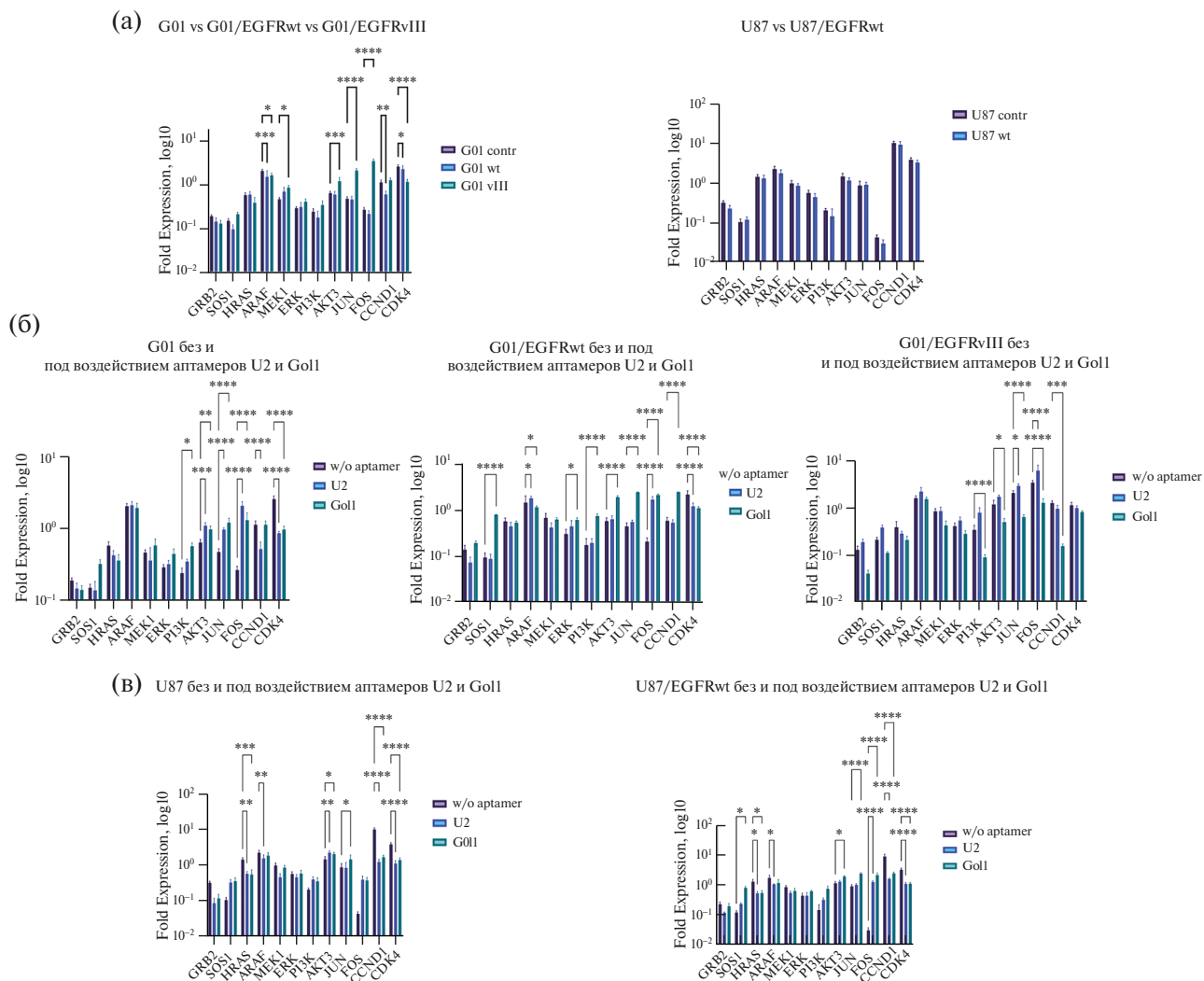


Рис. 3. Анализ изменения уровней экспрессии генов молекул каскада EGFR методом ПЦР-РВ в клетках глиобластомы человека до и после трансфекции (а), до и после добавления аптамеров U2 и Gol1 в клетках линии U87 (б) и клетках культуры G01 (в).

Экспрессию генов нормализовали относительно референсных генов *GAPDH*, *RPL13A* и *TBP*. Данные представлены в виде логарифмической шкалы среднего значения $\pm$ стандартная ошибка среднего, р-критерий считался значимым при $* = p < 0.05$, $** = p < 0.01$, $*** = p < 0.001$, $**** = p < 0.0001$ (ANOVA-тест). Все эксперименты проводились в трех повторностях.

Fig. 3. Analysis of changes in gene expression levels of EGFR cascade molecules by qPCR in human glioblastoma cells before and after transfection (a), before and after the addition of U2 and Gol1 aptamers in U87 line cells (б) and G01 culture cells (в). Gene expression was normalized relative to the reference genes *GAPDH*, *RPL13A* and *TBP*. The data are presented as a logarithmic scale of the mean value $\pm$ standard error of the mean, the p-criterion was considered significant at $* = p < 0.05$, $** = p < 0.01$, $*** = p < 0.001$, $**** = p < 0.0001$ (ANOVA test). All experiments were carried out in three replicates.

пролиферации клеток и их способности к выживанию (PI3K/Akt; RAS/MAPK; MAPK/CREB).

В клетках линии U87/EGFRwt не наблюдается статически значимых изменений экспрессии этих генов по сравнению с исходной U87 (рис. 3 (а)), в отличие от клеток культуры G01, полученных из ткани глиобластомы пациента. В клетках трансгенной культуры G01/EGFRwt наблюдался сниженный уровень экспрессии генов *CCND1* и *CDK4* ($p < 0.05$, $p < 0.01$), по сравнению с G01. Мы наблюдали статистически значимое снижение экспрессии гена *CDK4* в клетках G01/EGFRwt ($p < 0.01$) и в клетках G01/EGFRvIII ($p < 0.0001$), по сравнению с контрольной клеточной культурой G01. При этом в культуре G01/EGFRvIII значительно повышалась экспрессия генов *MEK1*, *JUN*, *FOS* и *AKT3*, по сравнению с контролем ($p < 0.05$).

Далее был проведен анализ изменения экспрессии генов отобранной панели в контрольных и трансфицированных клетках линии U87, а также в культуре глиомы человека G01 при воздействии аптамерами U2 и Gol1.

Анализ оценки влияния аптамера U2 на экспрессию отобранной панели генов в клетках культуры U87 показал статистически значимое снижение экспрессии генов *HRAS*, *ARAF*, *CCND1* и *CDK4*; а экспрессия *AKT3* повышается (рис. 3 (в)). Аналогичная картина наблюдается при добавлении к клеткам данной культуры аптамера Gol1, снижается экспрессия *HRAS*, *CCND1*, *CDK4* и повышается экспрессия *AKT3* и *JUN* (рис. 3 (в)). На трансгенные клетки U87wt аптамеры U2 и Gol1 оказывают практически такой же эффект, что и на контрольной культуре, но в данной культуре оба аптамера значительно повышают экспрессию *FOS*, аптамер U2 не влияет на экспрессию *AKT3*, а Gol1 повышает экспрессию *SOS1* (рис. 3 (в)).

Подобный анализ изменения экспрессии генов отобранной панели был проведен на клетках первичной культуры глиобластомы человека G01, G01/EGFRwt и G01/EGFRvIII (рис. 3 Б). В культуре G01 оба аптамера повышают экспрессию *PI3K* и *AKT3*, участвующих в PI3K/Akt-сигнальном пути, ассоциированном с выживаемостью клеток. Помимо этого, и U2, и Gol1 повышают экспрессию *JUN*, *FOS*. Интересно, что аптамер U2 снижает экспрессию *CCND1* и *CDK4*, а, как уже говорилось выше, как правило, экспрессия *JUN* и *FOS* имеет прямую корре-

ляцию с геном *CCND1*. Аптамер Gol1 не влияет на экспрессию *CCND1*, но снижает экспрессию *CDK4*.

В клетках культуры G01/EGFRwt наблюдается менее выраженный эффект аптамера U2, по сравнению с аптамером Gol1 (рис. 3 (б)), повышается экспрессия генов *ARAF*, *FOS* и снижается экспрессия *CDK4*. Аптамер Gol1 значительно увеличивает экспрессию *PI3K* и *AKT3*, как и экспрессию генов *JUN* и *FOS*, при этом показывая аналогичный эффект и на *CCND1*. Помимо этого, Gol1 увеличивает экспрессию генов *SOS1* и *ERK*.

Оптимальная картина наблюдается при оценке влияния аптамеров U2 и Gol1 на экспрессию панели отобранных генов в клетках культуры G01/EGFRvIII (рис. 3 (б)). В случае аптамера U2 наблюдается повышение экспрессии *JUN* и *FOS*, а аптамер Gol1 снижает экспрессию генов *JUN*, *FOS* и *CCND1*, обуславливающих пролиферацию клеток. При этом впервые наблюдается снижение генов, ассоциированных с выживаемостью клеток, таких как *PI3K* и *AKT3*.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В то время как редкие клетки в ГБ экспрессируют совместно EGFR и EGFRvIII, большинство опухолевых клеток экспрессируют преимущественно EGFR или EGFRvIII. Эти наблюдения предполагают иерархическую модель, в которой EGFR и EGFRvIII потенциально передают сигналы в компартменте опухолевых стволовых клеток и сегрегируют отдельно в дочерние клетки в опухоли (Sugawa et al., 1990) (рис. 4 (а)).

В опухолевых клетках, где EGFR и EGFRvIII экспрессируются совместно, EGFRvIII способствует росту клеток, экспрессирующих EGFR дикого типа, через паракринный интерлейкин 6 (IL-6) и/или LIF-зависимый путь. Эти цитокины активируют EGFR через гликопротеин 130 (GP130) (Reuter, Mathews, 2010). После связывания лиганда с внеклеточным доменом EGFR активируются зависимые от этого связывания сигнальные пути, такие как митоген-активируемые протеинкиназы, фосфоинозитид-3-киназа/Akt, киназа Jak/преобразователь сигнала и активатор транскрипции, а также фосфолипаза C- γ /пути протеинкиназы C (Goto et al., 2023; Wilson et al., 2014). Эти пути приводят к активации транскрипции генов-мишеней, которые важны для клеточной пролиферации, выживания, ми-

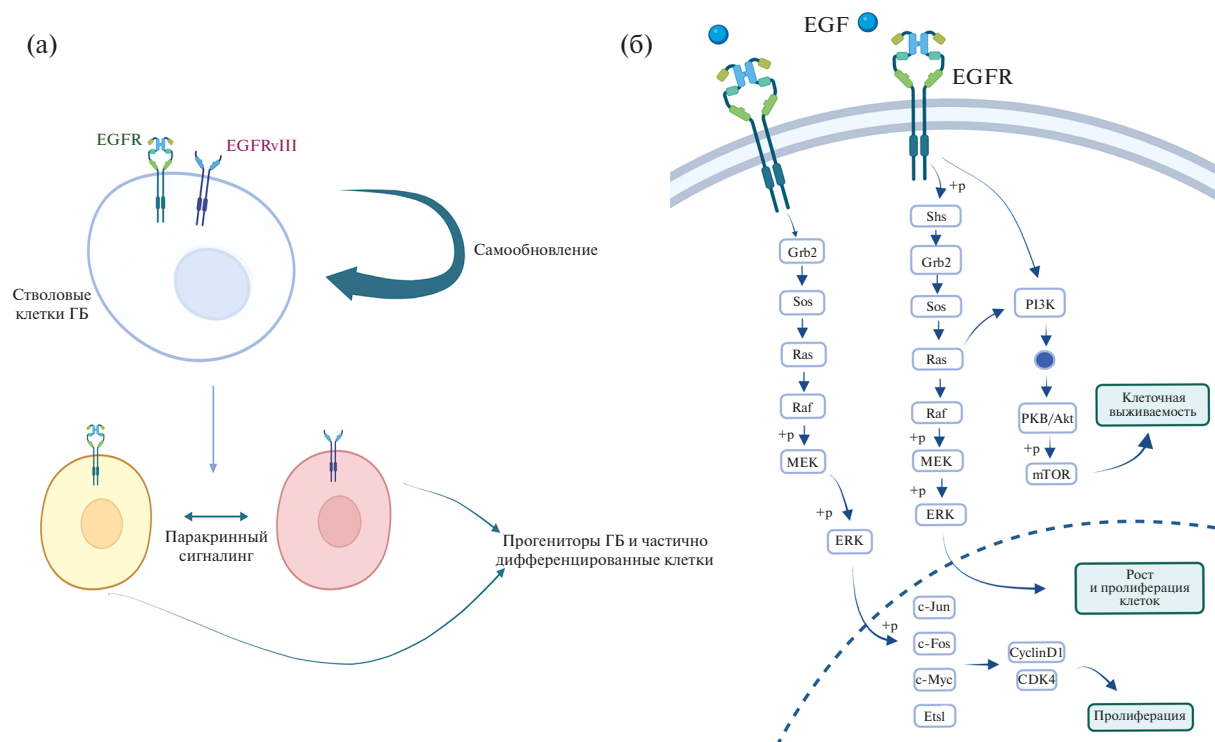


Рис. 4. (а) Иерархическая модель передачи сигналов EGFR и EGFRvIII. Клетки в опухолях глиобластомы человека, экспрессирующие EGFRvIII, могут передавать сигналы клеткам, экспрессирующим EGFR, и наоборот, паракринным образом (Cvrljevic et al., 2011); (б) Сигнальные пути EGFR в клетках глиомы, взято и адаптировано из KEGG PATHWAY.

Fig. 4. (a) Hierarchical model of EGFR and EGFRvIII signal transmission. Cells in human glioblastoma tumors expressing EGFRvIII can transmit signals to cells expressing EGFR, and vice versa, in a paracrine manner (Cvrljevic et al., 2011); (b) EGFR signaling pathways in glioma cells, taken and adapted from KEGG PATHWAY.

грации, инвазии и свойств, инициирующих опухоли (Cooper et al., 2022). Во многих карциномах гиперэкспрессия EGFR и его мутация участвуют в поддержании пролиферативной передачи сигналов, что является важным признаком рака (Hanahan, 2022; Hanahan, Weinberg, 2011).

Воздействие на столь важную терапевтическую мишень в клетках глиомы, как EGFR, влечет за собой ряд трудностей и неразрешенных вопросов. Препараты моноклональных антител, которые чаще всего используются в медицине для ингибирования EGFR, показывают крайне низкую эффективность при глиоме. Несмотря на применение при лечении других опухолей, ни одно из них не одобрено для лечения глиобластомы ввиду многочисленных отрицательных клинических испытаний (Zok et al., 2018). Аптамеры же представляют особый интерес, в связи с тем, что, как мы уже подчеркивали ранее, обладают продолжительной стабильностью, высокой аффинностью и специфичностью, а также низкой иммуногенностью и токсичностью (Lao

et al., 2015; Zhu, Chen, 2018). В исследовании китайских ученых, опубликованном в 2018 г., продемонстрировано, что аптамер U2 может влиять на рост клеток U87/EGFRvIII и их радиочувствительность. Было обнаружено, что аптамер U2 способен ингибировать пролиферацию, миграцию, инвазию и передачу сигналов в клетках U87/EGFRvIII. Таким образом, результаты показали многообещающий потенциал аптамера U2 как нового кандидата в качестве лекарства и системы доставки лекарств для терапии глиобластомы (Mayer, Arteaga, 2016).

В своей работе мы, наряду с аптамером U2, предположительно специфичным к EGFR дикого типа и EGFRvIII, тестируем его укороченную модифицированную форму – аптамер Goll, который, в связи с сохранением активного центра связывания, сохраняет высокую специфичность связывания с рецептором EGFR.

В данном исследовании получены валидные модели трансгенных клеточных культур G01/

EGFRwt и G01/EGFRvIII на основе эксплантата ткани глиобластомы человека G01, полученной от пациента НМИЦ нейрохирургии им. академика Н. Н. Бурденко. Гиперэкспрессия EGFRwt и EGFRvIII, подтвержденная методом Вестерн-блот-гибридизации, позволила провести апта-иммуноцитохимический анализ.

Анализ результатов окрашивания антителами показал, что EGFR в исследуемых препаратах локализуется по всей цитоплазме клеток, в некоторых случаях по ядерной мембране (рис. 2 (б)). В исследовании Brand и соавт. говорится, что альтернативная локализация EGFR от клеточной мембраны до ядра клетки может являться одним из механизмов устойчивости к ингибиторам EGFR (Brand et al., 2013). Кроме того, внутри ядра EGFR действует как ко-транскрипционный фактор для нескольких генов, участвующих в клеточной пролиферации и ангиогенезе, и как тирозинкиназа – для активации и стабилизации ядерного антигена пролиферирующих клеток и ДНК-зависимой протеинкиназы. Локализованный в ядре EGFR тесно связан с прогрессированием заболевания, ухудшением общей выживаемости при многих видах злокачественных образований и повышенной устойчивостью к лучевой терапии, химиотерапии, в том числе таргетной терапии против EGFR гефитинибом и цетуксимабом (David et al., 2005). Апта-иммуноцитохимией была показана специфичность аптамеров U2 и Gol1 к EGFRwt и EGFRvIII одинаковой окраской клеток антителами и аптамерами. Требуемым внимания фактом является блокирование аптамером Gol1 дальнейшей окраски антителами против EGFRvIII, что особенно наглядно представлено на клетках глиобластомы человека G01 с гиперэкспрессией EGFRvIII (рис. 2 (б)). На основе этого можно предположить конкурентное связывание аптамера и антитела со специфическим эпитопом EGFRvIII. Таким образом, можно утверждать, что оба отобранных аптамера проявляют высокую специфичность к клеткам с экспрессией EGFRwt и EGFRvIII, но при этом аптамер Gol1 демонстрирует более высокую конкурентоспособность связывания с EGFRvIII, по сравнению с аптамером U2 и антителами к EGFRvIII.

Результаты проточной цитометрии демонстрируют, что выбранные аптамеры U2 и Gol1 эффективно окрашивают клетки U87, U87/EGFRwt, G01/EGFRwt и G01/EGFRvIII, но в разной степени. U2 продемонстрировал более

высокую специфичность, что позволяет предположить либо дополнительную мишень, либо дополнительный эпитоп сродства у дикой формы EGFR.

Широко известно, что ингибирование EGFR подавляет пролиферацию и инвазию опухолевых клеток при глиобластоме (Brand et al., 2013; Odajima et al., 2005; Peng et al., 2020; Ratushny et al., 2009). Было выдвинуто предположение, что связывание аптамеров U2 и Gol1 с рецепторами EGFRwt и EGFRvIII приведет к ингибированию активности рецептора, соответственно, будет наблюдаться уменьшение амплификации генов молекул его сигнальных путей, таких как PI3K/Akt, RAS/MAPK, MAPK/CREB, JAK2/STAT, через которые опосредованы рост, пролиферация и выживание клеток глиомы (рис. 4 (б)).

PI3K/Akt-путь, помимо опухолевого роста и ангиогенеза, участвует в клеточной выживаемости (Yu, Cui, 2016). Кроме того, стоит обратить внимание на c-Fos. Например, Linder и соавт. в своей работе (Linder et al., 2018) утверждают, что у пациентов с остеосаркомой с ко-экспрессией EGFR и c-Fos снижается общая выживаемость. Также доклинические исследования с использованием ксенотрансплантатов остеосаркомы человека показали, что только опухоли, экспрессирующие как EGFR, так и c-Fos, реагировали на терапию против EGFR, демонстрируя, что c-Fos можно рассматривать как новый биомаркер, предсказывающий ответ на лечение анти-EGFR у пациентов с остеосаркомой (Pawson, 2004). Следовательно, когда мы говорим о противоопухолевой терапии, помимо снижения экспрессии генов, опосредующих пролиферацию и рост клеток, ожидается снижение выживаемости клеток, то есть экспрессии генов PI3K/Akt-сигнального пути и повышение экспрессии гена c-Fos.

Белок JUN в сочетании с белком Fos образует фактор транскрипции раннего ответа AP-1, который контролирует ряд клеточных процессов, включая дифференцировку, пролиферацию и апоптоз (Karppelmann et al., 2014). AP-1, в свою очередь, регулирует транскрипцию циклина D1 (CCND1) (Shen et al., 2008).

По данным литературы, экспрессия генов CCND1 и CDK4 имеет положительную ассоциацию с уровнем злокачественности опухоли (Fiano et al., 2003; Zhang et al., 2005). В своей работе ученые из США утверждают, что гены

CCND1 и CDK4 участвуют как непосредственно в пролиферации опухолевых клеток, так и в регуляции активности неопухолевых клеток микроокружения, что опосредованно влияет на злокачественную прогрессию (Ciznadija et al., 2011). При этом в другой работе авторы связывают высокую экспрессию CCND1 с хорошим прогнозом рака молочной железы (Peurala et al., 2013).

В работе Zhou и соавт. говорится о том, что генотипное профилирование показывает, что регуляторы клеточного цикла изменены в большинстве EGFR-амплифицированных опухолей, а комбинация ингибиторов циклинзависимой киназы 4/6 (CDK4/6) и EGFR предотвращает появление резистентности *in vitro* и *in vivo* (Zhou et al., 2017). При этом почти во всех случаях был отмечен рост экспрессии генов молекул, отвечающих за способность клетки к выживанию (PI3K, Akt).

В нашей работе при оценке изменения экспрессии генов отобранной панели в клетках контрольной культуры U87 и трансфицированной культуры U87wt не было обнаружено статистически достоверных различий. Под воздействием аптамеров U2 и G01 в обеих вышеперечисленных культурах наблюдалось снижение экспрессии генов, участвующих в пролиферации и росте клеток (*HRAS*, *HRAF*, *CCND1*, *CDK4*). Как отмечалось выше, соотношение экспрессии генов *CCND1* и *CDK4* имеет положительную ассоциацию со степенью злокачественности опухоли. Помимо этого, в клетках культуры U87wt наблюдалось значительное повышение экспрессии гена *FOS*, ассоциированного с благоприятным ответом на EGFR-ассоциированную терапию. Но также было зафиксировано повышение экспрессии гена *AKT3*, ассоциированного с выживаемостью клеток под воздействием аптамера G01 в двух культурах, а аптамера U2 — в контрольных клетках культуры U87.

Следовательно, можно сделать вывод, что клетки культуры U87 являются не лучшей моделью для оценки воздействия на EGFRvIII, поскольку, во-первых, трансфицированные клетки U87vIII продемонстрировали низкую выживаемость, а во-вторых, не было обнаружено статистически значимых изменений в экспрессии основных генов сигнальных путей, опосредованных EGFR, между клетками культур U87 и U87wt, что позволяет предположить низкий вклад мутантной формы рецептора EGFRvIII. Известно, что U87 уже стала достаточно однородной за длительное время использования в ис-

следованиях, что сильно отдаляет эту линию от, собственно, глиобластомы. Возможно, это одна из причин отсутствия результата.

В предлагаемой нами экспериментальной модели первичной клеточной культуры глиобластомы человека G01 был получен ожидаемый эффект. Мы показали, что в трансгенной культуре G01wt снижается экспрессия генов *ARAF*, *CCND1* и *CDK4*, то есть наблюдается тенденция к снижению злокачественности опухоли. В трансгенной культуре G01vIII также наблюдается снижение экспрессии генов *ARAF* и *CDK4*, но при этом не изменяется экспрессия гена *CCND1*; помимо этого, происходит значительное увеличение экспрессии генов *JUN* и *FOS*, опосредующих пролиферацию клеток, и гена *AKT3*, опосредующего клеточную выживаемость.

Аптамер U2 в контрольных клетках G01 увеличивает экспрессию генов *PI3K*, *JUN*, *FOS* и снижает экспрессию генов *CCND1*, *CDK4*, что в совокупности говорит о том, что аптамер снижает злокачественность опухоли, но увеличивает пролиферативный потенциал клеток и их устойчивость. На клетках культуры G01wt данный аптамер не демонстрирует влияние на выживаемость клеток, но увеличивает экспрессию генов *HRAS* и *FOS*, то есть стимулирует пролиферацию клеток, также он снижает экспрессию гена *CDK4*, но не влияет на экспрессию гена *CCND1*, вследствие чего мы не можем говорить о том, что аптамер снижает злокачественность клеток данной культуры. На клетках же культуры G01vIII аптамер U2 демонстрирует небольшое увеличение экспрессии генов *JUN* и *FOS*, но на экспрессию гена *CCND1*, которую опосредуют упомянутые выше два гена, он не влияет, из чего можно сделать вывод, что аптамер U2 не оказывает ощутимого эффекта на клетки, богатые мутантной формой рецептора EGFRvIII.

Наибольший интерес представляют результаты влияния аптамера G01 на клетки культуры G01, G01wt и G01vIII. В клетках G01 и трансфицированных клетках G01wt при воздействии G01 наблюдается увеличение экспрессии генов, отвечающих за выживаемость клеток, то есть *PI3K* и *AKT3*. В клетках G01vIII воздействие G01 снижает экспрессию этих генов, следовательно, потенциально снижает выживаемость клеток, которые, как известно из данных литературы, наиболее тяжело поддаются терапии. То есть аптамер G01, возможно, не только стимулирует

ет снижение выживаемости плохо поддающихся терапии клеток, но и стимулирует выживаемость клеток, которые характеризуются активным ответом на EGFR-опосредованную терапию. Помимо этого, в клетках культуры G01vIII данный аптамер снижает экспрессию генов, опосредующих пролиферацию и рост клеток, а именно генов *JUN*, *FOS* и *CCND1*. Как правило, клеточные агенты, снижающие пролиферацию клеток, стимулируют их выживаемость, в связи с чем можно назвать аптамер G01 многообещающей молекулой в дальнейшей анти-EGFRvIII-противоопухолевой терапии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Глиобластома является одной из наиболее острых проблем современности. С каждым годом наблюдается положительная динамика роста заболеваемости среди населения, при этом методы диагностики и терапии остаются малоэффективными. Одним из наиболее перспективных направлений для решения данной проблемы являются исследования на основе аптамеров.

Поскольку гиперэкспрессия EGFR или его мутантной формы EGFRvIII опосредует сигнальные пути, приводящие к пролиферации и инвазии опухолевых клеток, а также к повышению их выживаемости, в своей работе мы сосредоточились на аптамерах U2 и G01, специфичных именно к данным молекулам-мишеням.

На основе клеточной модели глиобластомы человека с гиперэкспрессией EGFR и EGFRvIII мы продемонстрировали специфичность отобранных аптамеров к целевым молекулам. При использовании метода апта-иммуноцитохимии было показано, что аптамер U2 более специфичен к дикому типу EGFR, а G01, напротив, к его мутантной форме EGFRvIII. Помимо этого, при гиперэкспрессии EGFRvIII аптамер G01 оказывал подавляющий эффект на экспрессию генов, связанных с пролиферацией и выживаемостью клеток (*JUN*, *FOS*, *CCND1*, *PI3K* и *AKT3*), в то время как аптамер U2 не продемонстрировал значимый эффект на клетках *in vitro*. Результаты исследований позволяют нам предположить, что аптамер G01 обладает терапевтическим и диагностическим потенциалом против опухолевых клеток глиобластомы человека, гиперэкспрессирующих рецептор мутантного типа EGFRvIII.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075–15–2021–1343).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Капурин А.Д. Злокачественные новообразования в России в 2021 г. МНИОИ им. П.А. Герцена — филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России. 2022.
- Babic I., Anderson E. S., Tanaka K., Guo D., Masui K., Li B., Zhu S., Gu Y., Villa G. R., Akhavan D., Nathanson D., Gini B., Mareninov S., Li R., Camacho C. E., Kurdistan S. K., Eskin A., Nelson S. F., Yong W. H., Cavenee W. K., Cloughesy T. F., Christofk H. R., Black D. L., Mischel P. S. EGFR mutation-induced alternative splicing of max contributes to growth of glycolytic tumors in brain cancer. *Cell Metabolism*. 2013. 17 (6): 1000–1008. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.04.013>
- Brand T. M., Iida M., Luthar N., Starr M. M., Huppert E. J., Wheeler D. L. Nuclear EGFR as a molecular target in cancer. *Radiother. Oncol.* 2013. 108 (3): 370–377. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2013.06.010>
- Ciznadija D., Liu Y., Pyonteck S. M., Holland E. C., Koff A. Cyclin D1 and Cdk4 mediate development of neurologically destructive oligodendroglioma. *Cancer Res.* 2011. 71 (19): 6174–6183. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-1031>
- Cooper A. J., Sequist L. V., Lin J. J. Third-generation EGFR and ALK inhibitors: mechanisms of resistance and management. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2022. 19 (8): 499–514. <https://doi.org/10.1038/s41571-022-00639-9>
- Cvrljevic A. N., Akhavan D., Wu M., Martinello P., Furnari F. B., Johnston A. J., Guo D., Pike L., Cavenee W. K., Scott A. M., Mischel P. S., Hoogenraad N. J., Johns T. G. Activation of Src induces mitochondrial localisation of de 2–7EGFR (EGFRvIII) in glioma cells: implications for glucose metabolism. *Journal of Cell Science*. 2011. 124 (17): 2938–2950. <https://doi.org/10.1242/jcs.083295>
- David J.-P., Mehic D., Bakiri L., Schilling A. F., Mandic V., Priemel M., Idarraga M. H., Reschke M. O., Hoffmann O., Amling M., Wagner E. F. Essential role of RSK2 in c-Fos-dependent osteosarcoma development. *J Clin. Invest.* 2005. 115 (3): 664–672. <https://doi.org/10.1172/JCI22877>
- Feng H., Hu B., Jarzynka M. J., Li Y., Keezer S., Johns T. G., Tang, C. K., Hamilton, R. L., Vuori, K., Nishikawa, R., Sarkaria, J. N., Fenton, T., Cheng, T., Furnari, F. B., Cavenee, W. K., Cheng, S.-Y. Phosphorylation of dedicator of cytokinesis 1 (Dock180) at tyrosine residue Y722 by Src family kinases mediates EGFRvIII-driven glioblastomatumorigenesis. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 2012. 109 (8): 3018–3023. <https://doi.org/10.1073/pnas.1121457109>
- Fiano V., Ghimenti C., Schiffer D. Expression of cyclins, cyclin-dependent kinases and cyclin-dependent kinase inhibitors in oligodendrogliomas in humans. *Neurosci. Letters*. 2003. 347 (2): 111–115. <https://doi.org/10.1016/>

- S0304–3940(03)00615–3
- Goto N., Suzuki H., Tanaka T., Ishikawa K., Ouchida T., Kaneko M. K., Kato Y. EMab-300 detects mouse epidermal growth factor receptor-expressing cancer cell lines in flow cytometry. *Antibodies* (Basel, Switzerland). 2023. 12 (3): 42. <https://doi.org/10.3390/antib12030042>
- Hammer S., Tschischek B., Flamm C., Hofacker I. L., Findeiß S. RNA blueprint: flexible multiple target nucleic acid sequence design. *Bioinformatics*. 2017. 33 (18): 2850–2858. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx263>
- Hammer S., Wang W., Will S., Ponty Y. Fixed-parameter tractable sampling for RNA design with multiple target structures. *BMC Bioinformatics*. 2009. 20 (1): 209. <https://doi.org/10.1186/s12859-019-2784-7>
- Hanahan D. Hallmarks of cancer: new dimensions. *Cancer Discovery*. 2022. 12 (1): 31–46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>
- Hanahan D., Weinberg R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011. 144 (5): 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Horvath S., Zhang B., Carlson M., Lu K. V., Zhu S., Felciano R. M., Laurance M. F., Zhao W., Qi S., Chen Z., Lee Y., Scheek A. C., Liao L. M., Wu H., Geschwind D. H., Febbo P. G., Kornblum H. I., Cloughesy T. F., Nelson S. F., Mischel P. S. Analysis of oncogenic signaling networks in glioblastoma identifies ASPM as a molecular target. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006. 103(46): 17402–17407. <https://doi.org/10.1073/pnas.0608396103>
- Kappelmann M., Bosserhoff A., Kuphal S. AP-1/c-Jun transcription factors: Regulation and function in malignant melanoma. *Eur. J. Cell Biol.* 2014. 93 (1–2): 76–81. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2013.10.003>
- Kopylov A. M., Fab L. V., Antipova O., Savchenko E. A., Revishchin A. V., Parshina V. V., Pavlova S. V., Kireev I. I., Golovin A. V., Usachev D. Y., Pavlova G. V. RNA aptamers for theranostics of glioblastoma of human brain. *Biochemistry* (Moscow). 2021. 86(8): 1012–1024. <https://doi.org/10.1134/S0006297921080113>
- Lao Y.-H., Phua K. K. L., Leong K. W. Aptamer nanomedicine for cancer therapeutics: barriers and potential for translation. *ACS Nano*. 2015. 9 (3): 2235–2254. <https://doi.org/10.1021/nn507494p>
- Linder M., Glitzner E., Srivatsa S., Bakiri L., Matsuoka K., Shahrouzi P., Dumanic M., Novoszel P., Mohr T., Langer O., Wanek T., Mitterhauser M., Wagner E. F., Sibilio M. EGFR is required for FOS-dependent bone tumor development via RSK2/CREB signaling. *EMBO Mol. Med.* 2018. 10: e9408. (11). <https://doi.org/10.15252/emmm.201809408>
- Mayer I. A., Arteaga C. L. The PI3K/AKT pathway as a target for cancer treatment. *Ann. Rev. Med.* 2016. 67 (1): 11–28. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-062913-051343>
- Odajima T., Sasaki Y., Tanaka N., Kato-Mori Y., Asanuma H., Ikeda T., Satoh M., Hiratsuka H., Tokino T., Sawada N. Abnormal β -catenin expression in oral cancer with no gene mutation: correlation with expression of cyclin D1 and epidermal growth factor receptor, Ki-67 labeling index, and clinicopathological features. *Hum. Pathol.* 2005. 36 (3): 234–241. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2004.12.009>
- Oprița A., Baloiș C., Staicu G.-A., Alexandru O., Tache D. E., Danoiu S., Micu E. S., Sevastre A. -S. Updated insights on EGFR signaling pathways in glioma. *Int. J. Mol. Sci.* 2021. 22 (2): 587. <https://doi.org/10.3390/ijms22020587>
- Pavlova G., Kolesnikova V., Samoylenkova N., Drozd S., Revishchin A., Usachev D., Kopylov A. Novel weapon to conquer human glioblastoma: G-quadruplexes and neuro-inducers. 2021.
- Pawson T. Specificity in signal transduction. *Cell*. 2004. 116(2): 191–203. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)01077-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)01077-8)
- Peng L., Liang Y., Zhong X., Liang Z., Tian Y., Li S., Liang J., Wang R., Zhong Y., Shi Y., Zhang X. Aptamer-conjugated gold nanoparticles targeting epidermal growth factor receptor variant III for the treatment of glioblastoma. *Int. J. Nanomed.* 2020. 15: 1363–1372. <https://doi.org/10.2147/IJN.S238206>
- Peurala E., Koivunen P., Haapasalo K.-M., Bloigu R., Jukkola-Vuorinen A. The prognostic significance and value of cyclin D1, CDK4 and p16 in human breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2013. 15 (1): R5. <https://doi.org/10.1186/bcr3376>
- Ratushny V., Astsaturov I., Burtneß, B. A., Golemis, E. A., & Silverman, J. S. Targeting EGFR resistance networks in head and neck cancer. *Cell. Signal.* 2009. 21 (8): 1255–1268. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2009.02.021>
- Reuter J. S., Mathews D. H. RNA structure: software for RNA secondary structure prediction and analysis. *BMC Bioinformatics*. 2010. 11 (1): 129. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-129>
- Shen Q., Uray I. P., Li Y., Krisko T. I., Strecker T. E., Kim H.-T., Brown P. H. The AP-1 transcription factor regulates breast cancer cell growth via cyclins and E2F factors. *Oncogene*. 2008. 27 (3): 366–377. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210643>
- Sugawa N., Ekstrand A. J., James C. D., Collins V. P. Identical splicing of aberrant epidermal growth factor receptor transcripts from amplified rearranged genes in human glioblastomas. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 1990. 87 (21): 8602–8606. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.21.8602>
- Wan Y., Kim Y., Li N., Cho S. K., Bachoo R., Ellington A. D., Iqbal S. M. Surface-immobilized aptamers for cancer cell isolation and microscopic cytology. *Cancer Res.* 2010. 70 (22): 9371–9380. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-0568>
- Ward A. F., Braun B. S., Shannon K. M. Targeting oncogenic Ras signaling in hematologic malignancies. *Blood*. 2012. 120 (17): 3397–3406. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-05-378596>
- Wilson T., Karajannis M., Harter D. Glioblastoma multiforme: State of the art and future therapeutics. *Surg. Neurol. Int.* 2014. 5 (1): 64. <https://doi.org/10.4103/2152-7806.132138>
- Wu X., Liang H., Tan Y., Yuan C., Li S., Li X., Li G., Shi Y., Zhang X. Cell-SELEX aptamer for highly specific radionuclide molecular imaging of glioblastoma in vivo. *PLoS ONE*. 2014. 9 (3): e90752. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090752>
- Xia W., Wei Y., Du Y., Liu J., Chang B., Yu Y.-L., Huo L.-F., Miller S., Hung M.-C. Nuclear expression of epidermal

- growth factor receptor is a novel prognostic value in patients with ovarian cancer. *Mol. Carcinogen.* 2009. 48 (7): 610–617. <https://doi.org/10.1002/mc.20504>
- Yu J. S. L., Cui W. Proliferation, survival and metabolism: the role of PI3K/AKT/mTOR signalling in pluripotency and cell fate determination. *Development.* 2016. 143 (17): 3050–3060. <https://doi.org/10.1242/dev.137075>
- Zhang X., Zhao M., Huang A., Fei Z., Zhang W., Wang X. The effect of cyclin D expression on cell proliferation in human gliomas. *J. Clin. Neurosci.* 2005. 12 (2), 166–168. <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2004.03.036>
- Zhou J., Wu Z., Wong G., Pectasides E., Nagaraja A., Stachler M., Zhang H., Chen T., Zhang H., Liu J. Bin, Xu X., Sicinska E., Sanchez-Vega F., Rustgi A. K., Diehl J. A., Wong K.-K., Bass A. J. CDK4/6 or MAPK blockade enhances efficacy of EGFR inhibition in oesophageal squamous cell carcinoma. *Nat. Commun.* 2017. 8 (1): 13897. <https://doi.org/10.1038/ncomms13897>
- Zhu G., Chen X. Aptamer-based targeted therapy. *Adv. Drug Del. Rev.* 2018. 134: 65–78. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.08.005>
- Zok T., Antczak M., Zurkowski M., Popena M., Blazewicz J., Adamiak R. W., Szachniuk M. RNAdbee 2.0: multi-functional tool for RNA structure annotation. *Nucl. Acids Res.* 2018. 46 (W1): W30–W35. <https://doi.org/10.1093/nar/gky314>

SPECIFICITY OF U2 AND GOL1 APTAMERS TO TGFR-POSITIVE HUMAN GLIOBLASTOMA CELLS *IN VITRO*

F. M. Dzarieva^{a, #}, D. V. Shamadykova^a, O. V. Sluchanko^b, S. A. Pavlova^a, L. V. Fab^a, A. V. Ryabova^c, D. Yu. Panteleev^a, A. M. Kopylov^d, D. Yu. Usachev^e, A. V. Golovin^{d, f}, G. V. Pavlova^{a, e, f, ##}

^a*Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology of the Russian Academy of Sciences (IHNA), Moscow, Russia*

^b*Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia*

^c*Prokhorov General Physics Institute, Moscow, Russia*

^d*M.V. Lomonosov Moscow State University (MSU), Moscow, Russia*

^e*N.N. Burdenko National Medical Research Center of Neurosurgery, Ministry of Healthcare of Russia, Moscow, Russia*

^f*I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (MSMU), Moscow, Russia*

[#]*e-mail: dz.fatima@mail.ru,*

^{##}*e-mail: lkorochnik@mail.ru*

Overexpression of the epidermal growth factor receptor (EGFR) or its mutations mediate signaling pathways leading to proliferation, invasion of tumor cells, as well as to an increase in their survival. Despite the success of the clinical use of antibodies against EGFR in patients with colorectal cancer and squamous cell carcinoma of the head and neck, their low effectiveness in glioblastoma has been shown. Therefore, for the treatment of gliomas, a specific EGFR drug is needed, capable of penetrating into the tumor focus in the brain, and having low immunogenicity.

In this work, aptamers – single-stranded DNA oligonucleotides specific to EGFR, U2 and Gol1 are presented as such a preparation. In this study, we obtained a cellular model of human glioma with EGFR and EGFRvIII overexpression, which showed the specificity of U2 and Gol1 aptamers to these receptors using classical methods, as well as the method of aptaimmunocytochemistry. A study of the effect of binding of the Gol1 aptamer to the EGFRvIII receptor on the next steps of the signaling pathway showed a change in the expression levels of genes associated with cell proliferation and survival (*JUN*, *FOS*, *CCND1*, *PI3K* and *AKT3*), while the U2 aptamer did not demonstrate a significant effect on cells *in vitro*.

These results showed that the Gol1 aptamer has therapeutic potential against human glioblastoma tumor cells overexpressing the EGFRvIII mutant type receptor.

Keywords: EGFR, EGFRvIII, glioblastoma, aptamer, glioma cell model, aptaimmunocytochemistry