

Том 88, Номер 7

ISSN 0320-9725

Июль 2023



БИОХИМИЯ

www.sciencejournals.ru



СОДЕРЖАНИЕ

Том 88, № 7, 2023

Биохимия опухолевых клеток (специальный выпуск)

Редактор выпуска – В.С. Покровский

Метаболизм сфинголипидов в опухолевых клетках (обзор) <i>В.С. Покровский, В.И. Иванова-Радкевич, О.М. Кузнецова</i>	1045
Молекулярный оркестр микробиотических метаболитов в сценарии канцерогенеза (обзор) <i>О.П. Шатова, А.А. Заболотнева, А.В. Шестопалов</i>	1069
Наследственные заболевания, ассоциированные с повышенным риском развития опухолей детского возраста (обзор) <i>Е.Н. Суспицын, Е.Н. Имянитов</i>	1085
Механизмы развития вторичных лейкозов, вызванных терапией с применением ингибиторов топоизомераз (обзор) <i>Н.А. Ломов, В.С. Вьюшков, М.А. Рубцов</i>	1101
Тиосульфаты: цитотоксическая и противоопухолевая активности (обзор) <i>В.В. Куликова, Е.А. Морозова, В.С. Коваль, П.Н. Сольев, <u>Т.В. Демидкина</u>, С.В. Ревтович</i>	1123
S-Глутатионилирование и S-нитрозилирование как модуляторы редокс-зависимых процессов в опухолевой клетке (обзор) <i>Е.В. Калинина, М.Д. Новичкова</i>	1137
Метиониновая зависимость раковых клеток — мишень метиониназы (обзор) <i>В.С. Покровский, Л. Або Кура, Е.А. Демидова, Ц. Хань, Р.М. Хоффман</i>	1162
Флуоресцентные конъюгаты на основе лигандов простатического специфического мембранного антигена как эффективное средство визуализации опухолей предстательной железы (обзор) <i>А.А. Успенская, П.А. Красников, А.Г. Мажуга, Е.К. Белоглазкина, А.Э. Мачулкин</i>	1173
Гистоновые метилтрансферазы как новая мишень эпигенетического действия вориностата <i>В.П. Максимова, Ю.В. Макусь, В.Г. Попова, А.Ю. Прус, О.Г. Усалка, Е.С. Трапезникова, Е.М. Жидкова, Г.А. Белицкий, М.Г. Якубовская, К.И. Кирсанов</i>	1191
Молекулярные механизмы модуляции стволовости опухолевых клеток при формировании сфероидов: обзор литературы (обзор) <i>А.С. Пономарев, З.Е. Гилязиева, В.В. Соловьева, А.А. Ризванов</i>	1204
Влияние внеклеточной ДНК из сыворотки крови здоровых мышей и мышей с метастатической меланомой В16 на изменение онкогенных свойств клеток меланомы <i>А.А. Филатова, Л.А. Алексеева, И.А. Савин, А.В. Сенькова, М.А. Зенкова, Н.Л. Миронова</i>	1223

- Исследование противоопухолевого потенциала солоксолон триптамида в отношении мультиформной глиобластомы с помощью *in silico*, *in vitro* и *in vivo* подходов
А.В. Марков, К.В. Одаренко, А.В. Сенькова, А.А. Ильина, М.А. Зенкова 1237
- Белок-белковые интерфейсы как мишени лекарств: общий для пиридоксаль-5'-фосфат-зависимых ферментов мотив для получения кофермента от его продуцентов
В.А. Алешин, В.И. Буник 1254
- Экспрессия, внутриклеточная локализация и созревание цистеиновых катепсинов в эмбриональной и опухолевых культурах клеток почки
А.С. Фролова, Н.К. Тихомирова, И.И. Киреев, Е.Ю. Зерний, А. Пароди, К.И. Иванов, А.А. Замятнин мл. 1268

CONTENTS

Vol. 88, Issue 7, 2023

Biochemistry of Cancer Cells (Special Issue)

Guest editor Vadim S. Pokrovsky

Metabolism of Sphingolipids in Tumor Cells (Review) <i>V. S. Pokrovsky, V. I. Ivanova-Radkevich, and O. M. Kuznetsova</i>	1045
Molecular Orchestra of Microbiotic Metabolites in the Scenario of Carcinogenesis (Review) <i>O. P. Shatova, A. A. Zabolotneva, and A. V. Shestopalov</i>	1069
Hereditary Conditions Associated with Elevated Cancer Risk in Childhood (Review) <i>E. N. Suspitsin and E. N. Imyanitov</i>	1085
Mechanisms for the Development of Therapy-Related Leukaemia Caused by Topoisomerase Inhibitors (Review) <i>N. A. Lomov, V. S. Viushkov, and M. A. Rubtsov</i>	1101
Thiosulfates: Cytotoxic and Antitumor Activity (Review) <i>V. V. Kulikova, E. A. Morozova, V. S. Koval, P. N. Solyev, <u>T. V. Demidkina</u>, and S. V. Revtovich</i>	1123
S-Glutathionylation and S-Nitrosylation as Modulators of Redox-Dependent Processes in Cancer Cell (Review) <i>E. V. Kalinina and M. D. Novichkova</i>	1137
Methionine Addiction of Cancer Cells Targeted by Methioninase (Review) <i>V. S. Pokrovsky, L. Abo Qoura, E. A. Demidova, Q. Han, and R. M. Hoffman</i>	1162
Fluorescent Conjugates Based on Prostatic Specific Membrane Antigen Ligands as an Effective Visualization Tool for Prostate Cancer (Review) <i>A. A. Uspenskaia, P. A. Krasnikov, A. G. Majouga, E. K. Beloglazkina, and A. E. Machulkin</i>	1173
Histone Methyltransferases as a New Target for the Epigenetic Action by Vorinostat <i>V. P. Maksimova, J. V. Makus, V. G. Popova, A. Yu. Prus, O. G. Usalka, E. S. Trapeznikova, E. M. Zhidkova, G. A. Belitsky, M. G. Yakubovskaya, and K. I. Kirsanov</i>	1191
Molecular Mechanisms of Tumor Cell Stemness Modulation during Formation of Spheroids: a Review (Review) <i>A. S. Ponomarev, Z. E. Gilazieva, V. V. Solovyova, and A. A. Rizvanov</i>	1204
Impact of Cell-Free DNA from Blood Serum of Mice with Metastatic Melanoma on the Enhancement of Oncogenic Properties of Melanoma Cells <i>A. A. Filatova, L. A. Alekseeva, I. A. Savin, A. V. Sen'kova, M. A. Zenkova, and N. L. Mironova</i>	1223
Evaluation of the Antitumor Potential of Soloxolone Tryptamide against Glioblastoma Multiforme Using <i>in silico</i> , <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> Approaches <i>A. V. Markov, K. V. Odarenko, A. V. Sen'kova, A. A. Ilyina, and M. A. Zenkova</i>	1237

Protein–Protein Interfaces as Druggable Targets: a Common Motif
of the Pyridoxal-5'-Phosphate-Dependent Enzymes to Receive the Coenzyme from Its Producers

V. A. Aleshin and V. I. Bunik

1254

Expression, Intracellular Localization and Maturation of Cysteine Cathepsins
in Renal Embryonic and Cancer Cell Lines

*A. S. Frolova, N. K. Tikhomirova, I. I. Kireev, E. Yu. Zernii, A. Parodi,
K. I. Ivanov, and A. A. Zamyatnin, Jr.*

1268

МЕТАБОЛИЗМ СФИНГОЛИПИДОВ В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ

Обзор

© 2023 В.С. Покровский*, В.И. Иванова-Радкевич, О.М. Кузнецова

Российский университет дружбы народов (РУДН),
117198 Москва, Россия; электронная почта: pokrovskiy-vs@rudn.ru

Поступила в редакцию 25.02.2023

После доработки 16.05.2023

Принята к публикации 17.05.2023

Метаболизм сфинголипидов, длительное время остававшийся на периферии фокуса исследований биохимиков, в последнее время стал привлекать всё большее внимание благодаря разнообразным и зачастую разнонаправленным эффектам сфинголипидов и их противоречивой роли в опухолевой прогрессии. Регуляция опухолевой прогрессии и способности организма подавлять рост и распространение опухоли во многом определяются балансом концентраций сфинголипидов в организме. Из всех сфинголипидов можно выделить церамиды, которые, в целом, обладают противоопухолевым действием, хотя конечная роль отдельного церамида в индукции гибели и выживания опухолевых клеток во многом определяется длиной его ацильного радикала. Действие церамидов может реализовываться посредством индукции апоптоза, аутофагии, торможением деления клеток, повышением иммуногенности, регуляцией стабильности клеточных мембран. Фосфорилированные производные церамид-1-фосфат и сфингозин-1-фосфат характеризуются как молекулы, стимулирующие пролиферацию и деление клеток, активирующие ангиогенез и лимфогенез, а также влияющие на миграцию опухолевых клеток, увеличивающие их подвижность. Опухолевую прогрессию активируют и другие сфинголипиды: цереброзиды, многие ганглиозиды, сульфатиды, сфингомиелины. Для многих сфинголипидов (например, сфингомиелинов, цереброзидов) показана связь с развитием лекарственной резистентности опухолевых клеток к химиотерапии. Вклад сфинголипидов в регуляцию указанных процессов, регулирующих опухолевую прогрессию, ферментов, участвующих в их метаболизме, и рецепторов сфинголипидов, выполняющих сигнальные функции, позволяет рассматривать их в качестве мишеней для противоопухолевой терапии. Настоящий обзор направлен на освещение основных путей метаболизма сфинголипидов в клетках человека с особым акцентом на известные особенности их обмена в опухолевых клетках.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: сфинголипид, опухоль, церамид, дигидроцерамид, сфингомиелин, сфингозин-1-фосфат, пролиферация, канцерогенез.

DOI: 10.31857/S0320972523070011, EDN: FUNUJO

ВВЕДЕНИЕ

Обмен сфинголипидов длительное время находился «на периферии» классической биохимии, и его изучение оставалось второстепенной темой в исследованиях липидов и липидомике. Сфинголипиды не играют энергетически значимой роли, как триацилглицеролы, не так заметны, с точки зрения

физиологии, как, например, холестерин и стероидные гормоны, и поэтому длительное время находились «в тени» других липидов. Вместе с тем в последние десятилетия увеличивается объём знаний об их сигнальной роли, участии в формировании рафтов клеточных мембран. Обычно при обсуждении сфинголипидов делается акцент на их обмен и функции в нейронах (поскольку наиболее ярко нарушения

Принятые сокращения: ФНО- α – фактор некроза опухоли α ; ARSase – арилсульфатаза; Cer – церамид; CERase – церамидаза; CerKase – церамидкиназа; CerSase – церамидсинтаза; CerSTase – цереброзидсульфотрансфераза; CERT – белок-транспортёр Cer; C1P – церамид-1-фосфат; DEGSase – дигидроцерамиддесатураза; DhCer – дигидроцерамид; DhS1P – дигидросфингозин-1-фосфат; ER – эндоплазматический ретикулум; GalCER – галактозилцерамид; GalCERase – галактозилцерамидаза; GalCerSase – галактозилцереброзидсинтаза; GluCER – глюкозилцерамид; GluCERase – глюкозилцерамидаза; PA – фосфатидная кислота; SM – сфингомиелин; SMase – сфингомиелиназа; SMSase – сфингомиелинсинтаза; Sph – сфингозин; SphKase – сфингозинкиназа; S1P – сфингозин-1-фосфат.

* Адресат для корреспонденции.

обмена сфинголипидов проявляются неврологическими симптомами).

В норме в здоровых клетках существует баланс между разными сфинголипидами, обеспечивающий нормальный рост, деление, дифференцировку и гибель ненужных клеток. Этот баланс обеспечивается ферментами синтеза и распада сфинголипидов. Изменение экспрессии или активности определённых ферментов может приводить к нарушению баланса, что, в свою очередь, может привести к усиленной пролиферации, миграции и инвазии, появлению химиорезистентности или, напротив, к активации апоптоза.

Реакции биосинтеза и катаболизма сфинголипидов иногда объединяют понятием сфинголипидный (или церамидный) цикл. Большинство реакций синтеза сфинголипидов обратимы и протекают в эндоплазматическом ретикулуме (ER) или на мембране ER, в аппарате Гольджи или митохондриях. Катаболизм сложных сфинголипидов происходит в лизосомах при участии лизосомальных ферментов [1]. На рис. 1 приведена общая схема метаболизма основных сфинголипидов клеток человеческого организма с указанием ферментов, катализирующих реакции синтеза и распада.

Увеличивающийся объём сведений о роли сфинголипидов в метаболизме и функционировании опухолевых клеток иллюстрируется количеством научных публикаций, индексируемых PUBMED: по обращению от 06.02.2023 по запросу «sphingolipids and cancer» PUBMED показывает 8155 научных публикаций, из которых первая опубликована в 1958 г., а максимальное их количество за всё время депонирования статей отмечалось в 2020, 2021 и 2022 гг. (366, 361 и 367 статей соответственно). Растущий объём научных сведений о метаболизме или роли сфинголипидов в опухолевых клетках побудил ряд авторов к систематизации полученных данных, и за последние 3 года был опубликован ряд обзорных работ. Большинство из них рассматривают сфинголипиды и их сигнальную роль как потенциальных мишеней для противоопухолевой терапии отдельных заболеваний (рака лёгкого [2], рака молочной железы [3], лимфом [4], множественной миеломы [5], глиом [6], опухолей желудочно-кишечного тракта [7]).

Некоторые, напротив, посвящены конкретным ферментам обмена сфинголипидов в опухолевых клетках (церамидкиназы [8], β -галактозилцерамидазы [9], или, например, обмену сфинголипидов в клетках гепатоцеллюлярной карциномы [5]). Отдельные прекрасно иллюстрированные обзорные работы освеща-

ют обмен сфинголипидов в целом [1, 10], однако их основной фокус также смещён на обсуждение роли отдельных звеньев метаболизма как мишеней для терапии.

Цель настоящей обзорной работы — систематизация имеющихся данных о метаболизме сфинголипидов с акцентами на особенности их обмена в опухолевых клетках в классическом биохимическом представлении. В данном обзоре последовательно рассмотрены ферменты синтеза и катаболизма основных сфинголипидов, их характеристики и вклад в механизмы гибели и выживания опухолевых клеток. Поскольку в большинстве классических учебников по биохимии отсутствуют разделы, посвящённые обмену сфинголипидов, настоящая обзорная работа, помимо научной, имеет также и образовательную направленность и нацелена на улучшение понимания молодыми исследователями этого сложного раздела биохимии.

СВЯЗЬ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ СИНТЕЗА СФИНГОЛИПИДОВ С ОПУХОЛЕВОЙ ПРОГРЕССИЕЙ

Синтез церамидов. В клетках млекопитающих существуют три основных пути, поддерживающих концентрацию церамидов (Cer):

- синтез *de novo* — из серина и пальмитоил-SKoA при участии ферментов, локализованных на цитоплазматической стороне мембраны ER;
- катаболизм сложных сфинголипидов (например, сфингомиелина (SM)) — при участии сфингомиелиназ (SMase) или фосфолипазы C протекает на плазматической мембране, в аппарате Гольджи и, вероятно, в митохондриях;
- катаболизм глюкоцереброзидов (GluCer) и галактоцереброзидов (GalCer) — протекает в лизосомах.

Cer, образующиеся в процессе синтеза *de novo* или при катаболизме сложных сфинголипидов, существенно отличаются как по химическому составу, так и по биологическим функциям. Протекание этих реакций в различных клеточных компартментах обуславливает преобладание Cer разного строения в разных компартментах клетки.

De novo Cer синтезируются в четырёх последовательных реакциях (рис. 1) [11]. Доказана значительная роль двух ферментов этого метаболического пути (церамидсинтазы и ди-гидроцерамиддесатуразы) в регуляции клеточного роста, пролиферации клеток и развитии противоопухолевого ответа. Церамидсинтаза

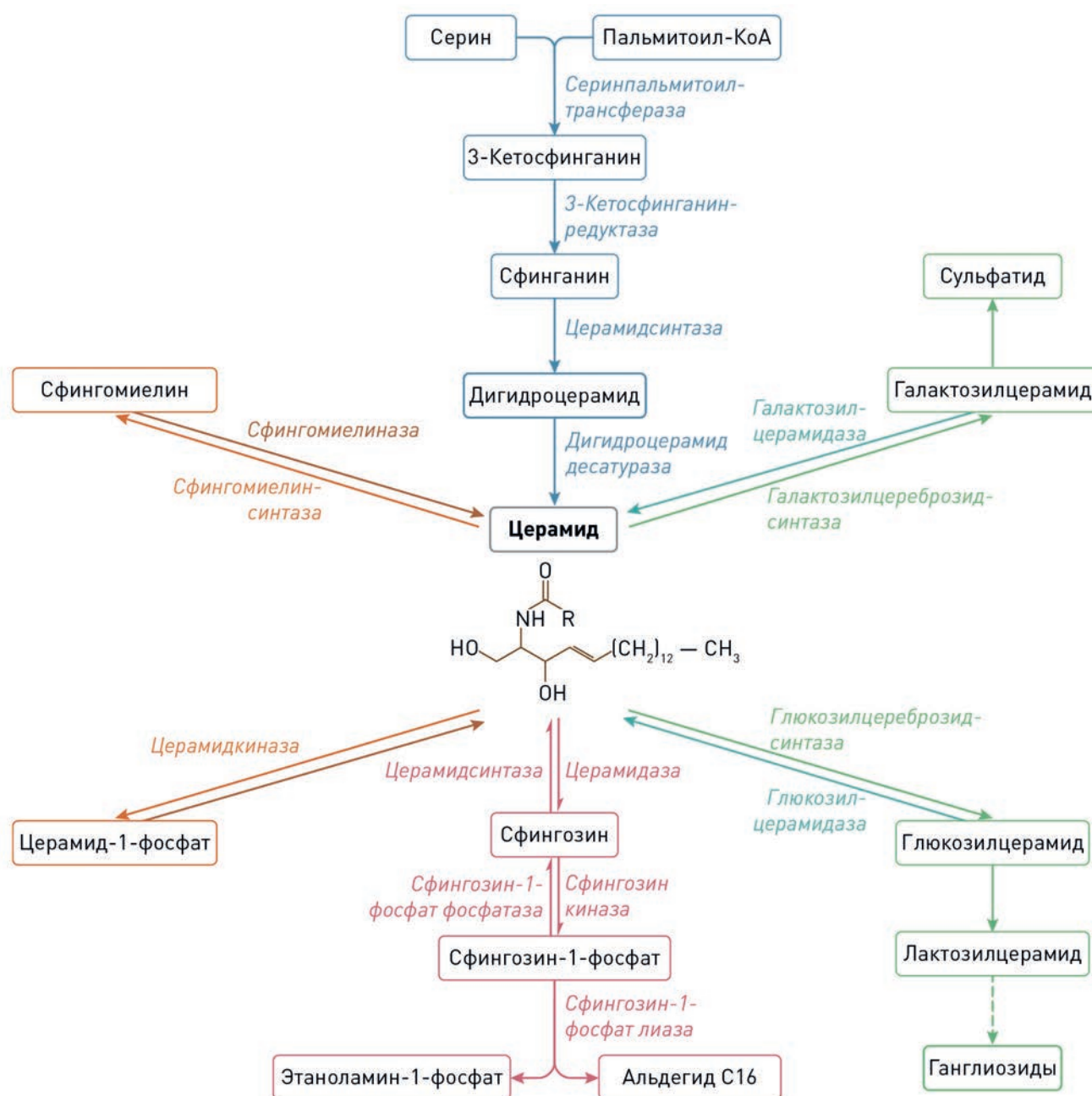


Рис. 1. Общая схема метаболизма сфинголипидов

(CerSase) катализирует синтез дигидроцерамида (DhCer) и имеет шесть различных изоформ, присоединяющих ацильные остатки, отличающиеся длиной углеводородной цепи и количеством двойных связей (табл. 1) [12].

Из-за более низкой, по сравнению с Cer, концентрации в тканях DhCer долгое время считались инертными липидами. К настоящему моменту благодаря технологическим достижениям в липидомных подходах, использованию фармакологических ингибиторов и трансгенных моделей все большее число свойств и функций приписывается DhCer, причём многие из

них отличаются или иногда противоположны спектру функций Cer.

Изменения уровня DhCer влияют на липидный состав мембран клеточных органелл, что провоцирует реакцию на окислительный стресс и стресс ER. В исследовании 2006 г. [13] сообщается, что как короткоцепочечные, так и длинноцепочечные DhCer ингибируют образование пор на внешней митохондриальной мембране, опосредованное Cer, что является критическим этапом для прогрессирования апоптоза. DhCer накапливаются *in vitro* и *in vivo* независимо от фактора HIF, отрицательно

Таблица 1. CerSase организма человека [12]

Фермент	Ген	Субстрат	Экспрессия
CerSase 1	<i>CERS1</i>	ацил-SKoA 18:0	головной мозг; в меньшей степени — в скелетных мышцах и тестикулах
CerSase 2	<i>CERS2</i>	ацил-SKoA с длинной цепью (20–26 атомов C)	повсеместно, с наибольшей экспрессией в ЦНС, гепатоцитах, клетках почек и лёгких
CerSase 3	<i>CERS3</i>	ацил-SKoA с очень длинной цепью (22–32 атомов C и более), включая полиненасыщенные и 2-гидроксированные производные	кератиноциты кожи, герминогенные клетки тестикул
CerSase 4	<i>CERS4</i>	ацил-SKoA с длинной цепью (18–22 атомов C)	кожа, миокард, жировая ткань, лейкоциты, гепатоциты
CerSase 5	<i>CERS5</i>	ацил-SKoA с длинной цепью (16–18 атомов C)	повсеместно, с наибольшей экспрессией в ЦНС, эпителии лёгких
CerSase 6	<i>CERS6</i>	ацил-SKoA со средней длиной цепи (14–16 атомов C)	энтероциты, клетки почек, лимфатических узлов

Таблица 2. Дигидроцерамиддесатуразы организма человека [15–17]

Фермент	Ген	Субстрат	Внутриклеточная локализация	Экспрессия
Дигидроцерамиддесатураза 1	<i>DEGS1</i>	DhCer	мембрана ER, митохондриальная мембрана	повсеместно; в наибольшей степени — печень, почки, лёгкие
Дигидроцерамиддесатураза 2	<i>DEGS2</i>	DhCer	мембрана ER	кожа, кишечник, почки

влияя на пролиферацию клеток. Влияние гипоксии на синтез DhCer было подтверждено в исследовании *in vivo*, где гипоксия приводила к снижению уровня Cer, но повышению уровня DhCer. DhCer были охарактеризованы как молекулы, обладающие антипролиферативными и иммунорегуляторными свойствами. Часто различные DhCer обладают двунаправленным действием: их высокие концентрации вызывают окислительный стресс, и их образование индуцируется окислительным стрессом [14].

Cer образуется из DhCer под действием дигидроцерамиддесатуразы (DEGSase). У человека идентифицированы две DEGSase — DEGSase1 и DEGSase2 (табл. 2).

Результаты исследования Guo et al. [18] показали онкогенную роль DEGSase2 в развитии колоректального рака, m6A-зависимое изменение DEGSase2 способствует прогрессии опухоли и развитию метастазов, подавляя синтез Cer. Кроме того, экспрессия *DEGS2* значительно увеличивается в тканях рака толстой кишки по сравнению с нормальными тканями

и коррелирует с реакцией на иммунотерапию с неблагоприятным прогнозом. Таким образом, DEGSase2 является потенциальным прогностическим фактором и терапевтической мишенью при раке толстой кишки.

Активность DEGSase1 может изменяться под действием различных модуляторов, что приводит к изменению соотношения DhCer/Cer (рис. 2). Это влияет на различные клеточные процессы, такие как апоптоз, клеточная пролиферация, аутофагия и резистентность к инсулину.

Исследования Hernández-Tiedra et al. [19], проведённые на клетках U87MG (линия клеток глиомы человека), показали, что изменение соотношения DhCer/Cer в пользу DhCer активирует аутофагию и апоптоз и ингибирует рост опухоли. Авторы предполагают, что воздействие дельта-9-тетрагидроканнабинола на клетки может частично ингибировать DEGSase1.

Образованные под действием DEGSase гидрофобные молекулы Cer объединяются в богатые Cer микродомены, стабилизируя мем-



Рис. 2. Факторы, влияющие на баланс DhCer/Cer

бренные рафты, что может привести к активации сигнальных каскадов за счёт облегчения межбелковых взаимодействий, включая димеризацию рецепторных белков и снижение порога активации клеточных сигнальных путей. Такое действие Cer можно рассматривать, по крайней мере частично, как общий механизм реорганизации потенциальных сигнальных молекул внутри мембран [3, 20].

Накопление избыточного количества Cer может быть токсичным, поэтому свободные Cer в норме присутствуют в клетках в незначительном количестве, их относительно высокие концентрации наблюдаются только в кератиноцитах кожи. В большинстве клеток Cer быстро расходуются для последующих реакций синтеза сложных сфинголипидов. Как было отмечено выше, образование Cer *de novo* протекает на цитоплазматической стороне мембраны ER, а последующий синтез сложных сфинголипидов – в аппарате Гольджи [1, 14].

Транспорт Cer может осуществляться везикулярно и неvesикулярно, он может быть АТФ-зависимым и АТФ-независимым. Неве-

зулярный транспорт требует участия транспортных белков, таких как белок-транспортёр Cer (CERT) массой 68 кДа, который локализован в цитоплазме и имеет сайт связывания с Cer. Белок обладает строгой специфичностью и не переносит другие липиды (холестерин, фосфолипиды и др.), хотя обладает слабым сродством к диацилглицеролам. Эффективность переноса зависит от длины ацильных радикалов. Наиболее эффективно происходит перенос Cer(C14:0–C20:0), скорость переноса Cer(C22:0) и Cer(C24:1) составляет ~40% от скорости более коротких Cer, а перенос Cer(C24:0) практически не происходит. Считается, что преференциальное распознавание ацильных радикалов Cer белком CERT отражает состав радикалов, входящих в SM и GluCer [21]. Попадая в состав внешнего слоя мембраны аппарата Гольджи, молекула Cer переносится на внутреннюю мембрану, где служит субстратом для синтеза сложных сфинголипидов. В этом процессе используются преимущественно Cer(C16–18), которые избирательно извлекаются белком CERT из клеточных

мембран и перенаправляются в аппарат Гольджи. Cer, содержащие более длинные остатки жирных кислот (Cer(C20–26)), дольше сохраняются в составе мембран. Ряд экспериментальных работ показывает снижение синтеза SM в условиях отсутствия CERT [22].

Открытие и клонирование CerSase1–6 стало ключом к пониманию роли Cer с различной длиной ацильной цепи в передаче сигналов в опухолевых клетках. Например, было обнаружено, что экспрессия CerSase1 подавляется в клетках рака головы и шеи с помощью гистоновой деацетилазы 1 (HDAC1) и miR5745p (микроРНК, регуляция транскрипции генов, межклеточная коммуникация, транспорт в составе везикул), таким образом, ингибируя синтез Cer(C18:0). Генерируемый CerSase1 Cer(C18:0) индуцировал гибель клеток и подавление опухолевого роста в клеточных культурах и ксенотрансплантатах плоскоклеточного рака головы и шеи. Примерно у 50% мышей с потерей активности CerSase2, который участвует в синтезе длинноцепочечных Cer(C22–24), развивалась феохромоцитома из-за возможных дефектов апоптоза [23]. CERS6, синтезирующий Cer(C16:0), был идентифицирован как транскрипционная мишень p53. Уровень CERS6 повышается в ответ на повышение экспрессии p53 или фолатный стресс, который, как известно, активирует p53. Это подтверждает, что CERS6 является компонентом негенотоксического p53-зависимого клеточного стресса. [24]. Cer(C16:0), генерируемый CerSase6, повышает чувствительность к лигандам, индуцирующим апоптоз, вызванный фактором некроза опухоли (TRAIL) в клетках рака толстой кишки. Предполагается, что Cer(C16:0) влияет на механизмы, ответственные за активный транспорт (транслокацию) каспазы-3 в ядро или может непосредственно влиять на проницаемость ядерной мембраны за счёт увеличения размера пор [25].

Cer(C16:0) индуцирует BAX-опосредованный апоптоз в ответ на облучение в клетках HeLa37. Связанный с митохондриями антиапоптотический белок Bcl2-подобный белок 13 (BCL2L13) непосредственно ингибирует синтез Cer в клеточных линиях глиобластомы и ксенотрансплантированных опухолях у мышей путём связывания с CerSase2 и CerSase6, таким образом, блокируя их гомодимеризацию и гетеродимеризацию [26].

Повышенные уровни Cer(C16:0), генерируемого CerSase6, были обнаружены в тканях рака лёгких и ротовой полости по сравнению с соответствующими здоровыми тканями. Неожиданно было обнаружено, что Cer(C16:0), генерируемый CerSase6, защищает целостность

мембран ER и Гольджи в клетках HNSCC; подавление CerSase6 изменяет доставку активирующего фактора транскрипции 6 (ATF6) и вызывает его aberrантную активацию, что приводит к ER-стресс-опосредованной гибели клеток HNSCC. В исследовании Chen et al. [27] была показана сильная корреляция между резистентностью к химиотерапии у пациенток с трижды негативным раком молочной железы и повышенной экспрессией CerSase6.

В целом, эти исследования подтверждают идею о том, что Cer, генерируемые CerSase, с различными жирными ацильными цепями играют разные роли в индукции гибели и выживания раковых клеток, которые зависят от типа ткани или клетки [28, 29].

При сравнении опухолей молочной железы со здоровыми тканями общий уровень эндогенных Cer был значительно повышен в злокачественной (12-кратно) и доброкачественной (4-кратно) тканях молочной железы по сравнению с нормальной тканью. Это повышение уровня Cer было довольно неожиданным, потому что исследования *in vitro* в основном показывали, что увеличение уровня Cer ассоциировано с индукцией апоптоза, и поэтому в первую очередь связано с антиканцерогенными эффектами [29]. В плоскоклеточных карциномах головы и шеи человека было обнаружено как увеличение Cer(C16:0), Cer(C24:1) и Cer(C24:1), так и снижение Cer(C18:0) [30].

Кроме того, увеличение концентрации Cer(C16:0), синтезированного под действием CerSase5 или CerSase6, приводит к активации теломеразы. Напротив, повышение концентрации Cer(C18:0), синтезированного под действием CerSase1, приводит к ингибированию активности теломеразы [24].

Синтез сфингомиелинов. Многими исследованиями доказано, что SM обладает способностью стимулировать опухолевый рост. Аномальное увеличение содержания SM в апикальном слое поверхностной мембраны снижает текучесть и проницаемость мембраны, увеличивает её жёсткость и прочность, что затрудняет межклеточную коммуникацию, снижает экспрессию молекул на клеточной поверхности и ухудшает координацию сигнальных путей, активируя рост и неконтролируемую пролиферацию клетки, повышая её способность к миграции и инвазии [31]. Основные сигнальные пути, через которые SM реализует свои эффекты, – RhoA/ROCK/LIMK/кофилин, RhoA/ROCK/FAK/паксиллин [32], TGF-β/Smad и стимуляция EMT [33].

Активация метастазирования вследствие высокого уровня SM впервые была показана

Таблица 3. SMSase организма человека [35, 36]

Фермент	Ген	Внутриклеточная локализация	Субстрат	Экспрессия
SMSase1	<i>SMS1</i>	<i>цис</i> -аппарат Гольджи	субстратом могут являться как короткоцепочечные, так и длинноцепочечные Cer и фосфатидилхолин	во всех нормальных клетках
SMSase2	<i>SMS2</i>	плазматическая мембрана, небольшое количество в аппарате Гольджи		во всех нормальных клетках; также экспрессируется в ряде клеточных линий, таких как клетки карциномы HeLa, клетки гепатомы Hep-G2 и клетки рака толстой кишки Caco-2

в экспериментах на метастатических вариантах клеточных линий аденокарциномы предстательной железы [34]. Вероятный механизм этого эффекта связан с тем, что накопление SM в наружной мембране приводит к образованию дополнительных водородных связей с соседними молекулами и молекулами воды и, как следствие, нарушению взаимодействий клеток с соседними клетками и внеклеточным матриксом. Способность образовывать подобную сеть межмолекулярных водородных связей является отличительной способностью SM в отличие, например, от глицеролипидов, сложноэфирные группы которых способны действовать только как акцепторы водородных связей, но не как доноры [31].

SM образуется в реакции, катализируемой сфингомиелинсинтазой (SMSase). SMSase имеет две изоформы (табл. 3). Одна из изоформ фермента, SMSase1, локализуется в мембранах *транс*-Гольджи, вторая, SMSase2, находится в ассоциации с плазматической мембраной. Такое расположение SMSase в клетке обуславливает высокую концентрацию SM во внешней плазматической мембране и люминальной мембране *транс*-Гольджи (при этом попадающие в мембрану *цис*-Гольджи Cer используются преимущественно для синтеза GluCer, а не SM) [35].

Остаётся спорным вопрос о вкладе двух изоформ SMSase в продукцию SM и их роли в канцерогенезе. Во многих исследованиях продемонстрировано, что пролиферация и метастазирование опухолевых клеток в большей степени связаны с активностью SMSase2, но не SMSase1. Так, в исследовании Jing et al. [32] было показано, что снижение активности SMSase2 тормозит миграцию, рост и выживаемость клеток рака яичников, а Zheng et al. [33] продемонстрировали повышенную экспрессию SMSase2 при метастазирующем раке молочной железы.

Однако SMSase1 безусловно играет определённую роль в канцерогенезе. В исследованиях Van der Luit et al. [37] было показано, что низкая активность SMSase1 в клетках мышечной лимфомы S49 снижает содержание SM в липидных рафтах и тормозит апоптоз клеток, индуцированный алкиллизофосфолипидами.

С другой стороны, в работе Tafesse et al. [36] на клеточной линии карциномы шейки матки было показано, что SMSase1 и SMSase2 совместно экспрессируются в различных типах клеток и одинаково необходимы для полноценного синтеза сфингомиелинов. Опосредованное РНК-интерференцией снижение синтеза либо SMSase1, либо SMSase2 в обоих случаях привело к существенному снижению уровня продукции SM, накоплению Cer и торможению роста клеток. Авторами было сделано ещё одно интересное наблюдение. Хотя клетки, дефицитные по SMSase, демонстрировали пониженное содержание SM, добавление экзогенного SM не восстанавливало рост клеток. По мнению авторов, эти результаты показывают, что биологическая роль SMSase выходит за рамки образования SM.

Активность SMSase в опухолевых клетках тесно связана с их чувствительностью к химиотерапии. Так, ингибирование SMSase2 значительно повышает эффективность цисплатина [32], а клетки лейкоза HL-60/ADR, резистентные к доксорубину, показывают значительное повышение активности SMSase по сравнению с нерезистентными клетками той же линии [38].

Синтез cerebroзидов. Cerebroзиды также обладают способностью потенцировать опухолевый рост. В клетках организма человека синтезируются два варианта cerebroзидов (моноглицозилцерамидов): GalCer и GluCer.

Сдвиг баланса между церамидами и их гликозилированными формами, обусловленный в том числе изменением активности ферментов

их синтеза, в сторону последних лежит в основе повышения пролиферативной и инвазивной активности опухолевых клеток [39, 40], а также в основе механизма лекарственной устойчивости к некоторым противоопухолевым препаратам [39]. Так, имеются данные, что на поверхности многих опухолевых клеток гиперэкспрессируется GalCer, который вызывает уменьшение клеточной адгезии и ингибирует апоптоз, что приводит к усилению клеточного роста, миграции и увеличению выживаемости клеток, что, в свою очередь, способствует канцерогенезу [39].

Как и другие сфинголипиды, цереброзиды могут участвовать в регуляции пролиферации и метастазирования опухолевых клеток через путь Wnt и β -катенина [41]. Так, GluCer увеличивает экспрессию транспортера MDR1, связанного с мультилекарственной резистентностью, через торможение деградации β -катенина и увеличение его транспорта в ядро [42]. Интересно, что GalCer может играть роль в трансмембранной передаче сигнала посредством изменения внутриклеточного уровня ионов кальция. Joshi и Mishra [43] показали, что воздействие антител к GalCer вызывает увеличение концентрации ионов кальция внутри клетки, что связано с поступлением ионов через плазматическую мембрану и высвобождением из внутриклеточных пулов.

Реакции синтеза GalCer протекают в ER при участии галактозилцереброзидсинтазы (GalCerSase). Максимальная экспрессия GalCerSase наблюдается в олигодендроцитах, шванновских клетках, клетках эпителия почек и тестикулах. Синтез GluCer протекает на мембране аппарата Гольджи при участии глюкозилцереброзидсинтазы (GluCerSase) [44].

Исследования Cabot et al. [45] продемонстрировали повышенные клеточные уровни GluCer в нескольких клеточных линиях с множественной лекарственной устойчивостью (включая линию рака молочной железы MCF-7-AdrR, устойчивую к винбластину эпидермоидную карциному KB-V-1 и аденокарциному яичников OVCAR-3). Авторы связали эти изменения с активацией синтеза GluCer, поскольку скорость его распада в этих экспериментах снижена не была. Сопоставимое увеличение содержания GluCer было также зарегистрировано в химиорезистентных образцах опухолей человека [46]. Искусственное повышение экспрессии GluCerSase в клетках рака молочной железы MCF-7 дикого типа и лейкозах также приводило к резистентности к химиотерапии [38, 45]. Активность GalCerSase повышена в опухолевых клетках, при этом

в большей степени в клетках, резистентных к химиотерапии, чем в чувствительных к ней. Так, Itoh et al. [38] показали 2-кратное повышение активности GalCerSase в клетках лейкоза HL-60/ADR, резистентных к доксорубину, по сравнению с нерезистентными клетками той же линии.

Синтез ганглиозидов. Некоторые ганглиозиды регулируют передачу сигнала через рецепторные тирозинкиназы [47]. Как правило, они образуют комплексы с несколькими типами рецепторных тирозинкиназ в липидных рафтах опухолевых клеток. Эти взаимодействия способствуют активации или ингибированию передачи сигналов через рецепторные тирозинкиназы. Изменения в содержании ганглиозидов на плазматической мембране влияют на молекулярный состав и структуру липидных рафтов, что может приводить к реорганизации и/или исключению рецепторных тирозинкиназ из липидных рафтов [48].

Для эффективной передачи сигналов апоптоза существенное значение имеет локализация рецептора смерти CD95 в липидных рафтах. Структура и состав содержащих ганглиозиды липидных рафтов играют решающую роль в регуляции гибели или выживания клеток [48]. На модели лимфоидных и миелоидных опухолевых клеток было продемонстрировано, что ганглиозиды могут запускать апоптоз путём активации рецепторов смерти CD95 и накапливаться в митохондриальных мембранах, что нарушает трансмембранный потенциал митохондрий и индуцирует апоптоз по каспазо-независимому пути [49].

В исследовании Veldman et al. [50] на модели опухолевых клеток с множественной лекарственной устойчивостью был показан низкий уровень лактозилцереброзидов и ганглиозидов с одновременным повышением уровней GluCer, GalCer и SM. По мнению авторов, в этих клетках происходит блокада пути биосинтеза гликолипидов на уровне образования лактоцереброзидов с сопутствующим накоплением GluCer.

Роль разных типов ганглиозидов и ферментов их синтеза и распада в регуляции процессов гибели и выживания опухолевых клеток подробно описана в недавнем обзоре Sasaki et al. [48] и в настоящем обзоре в деталях не рассматривается.

Синтез сульфатидов. Сульфатиды образуются при помощи цереброзидсульфотрансферазы (CerSTase) (кодируется геном *GAL3ST1*) в просвете аппарата Гольджи. Вновь синтезированные сульфатиды и «старые» сульфатиды плазматической мембраны и ER могут

перераспределяться внутри клетки при помощи везикулярного транспорта с участием клатрина или с помощью белков-переносчиков, таких как белок-переносчик гликолипидов (GLTP). Кроме непосредственного участия в транспорте сульфатидов, GLTP действует как сенсор уровня гликолипидов [51].

Сульфатиды синтезируются различными типами клеток, но больше всего их содержится в миелиновых оболочках олигодендроцитов центральной нервной системы и в шванновских клетках периферической нервной системы, где они составляют 4–7% всех липидов. Они также обнаруживаются в других клетках глии, таких как астроциты, где они продуцируются в небольших количествах, а также в нейронах, куда они попадают в основном в результате эндоцитоза. В больших количествах сульфатиды присутствуют в почках человека, слизистой оболочке желудка и двенадцатиперстной кишки, клетках островков Лангерганса поджелудочной железы, а также в мембранах клеток крови, таких как эритроциты, тромбоциты и гранулоциты [52].

Повышенная концентрация сульфатидов, а также повышенная экспрессия CerSTase были обнаружены в различных типах опухолей. Так, увеличение количества сульфатированных гликолипидов, наблюдаемое в клетках и тканях рака почки по сравнению с нормальной тканью, было обусловлено повышенной экспрессией и активностью CerSTase при неизменной активности арилсульфатазы A (ARSase). Кроме того, высокий уровень активности этого фермента был обнаружен в сыворотке пациентов с почечно-клеточной и гепатоцеллюлярной карциномой по сравнению со здоровыми пациентами. Однако, в отличие от почечно-клеточной карциномы, при гепатоцеллюлярной карциноме высокий уровень активности CerSTase у пациентов не коррелировал с уровнем активности этого фермента в опухолевой ткани и был аналогичен таковому в нормальной ткани. Напротив, при раке желудка уровень экспрессии CerSTase варьировал от случая к случаю как у больных, так и у здоровых людей [52, 53]. На клетках SMKT-R3 рака почки человека было показано, что увеличение активности сульфотрансферазы может быть обусловлено действием фактора некроза опухоли α (ФНО- α): секретлируемая форма ФНО- α связывается с клеточным рецептором, также возможен прямой контакт между соседними клетками с участием мембранной формы ФНО- α . Активность сульфотрансферазы в указанных клетках карциномы почки увеличивалась и при

добавлении в среду эпидермального фактора роста (EGF) [53, 54].

Повышенные уровни сульфатидов обнаружены при высокодифференцированной аденокарциноме эндометрия, некоторых типах опухолей лёгких, опухолей головного мозга и толстой кишки, гепатоцеллюлярном раке и раке яичников. Существуют работы, обосновывающие использование сульфатидов в качестве ранних маркеров диагностики рака яичников. Так, используя комбинацию масс-спектрометрического анализа метаболитов и профилей экспрессии генов, было установлено, что уровни сульфатидов повышены при раке яичников по сравнению с нормальной тканью яичников. В соответствии с этим наблюдением, более высокие уровни мРНК, кодирующей ферменты GalCerSase и CerSTase, необходимые для синтеза сульфатидов, также обнаруживаются в эпителиальных клетках карциномы яичников, в то время как уровни ARSase, сапозина и GalCERase остаются неизменными [51].

Для клеточных линий карциномы почек человека заметное увеличение активности мРНК CerSTase и CerSTase наблюдалось в 6 клеточных линиях (SMKT-R1, SMKT-R2, SMKT-R3, SMKT-R4, TOS-1 и TOS-2), в то время как клетки ACHN показали лишь небольшое увеличение по сравнению с нормальными клетками. При опухоли Вильмса (нефробластома) не обнаружено повышения концентрации сульфатидов. Таким образом, повышенная экспрессия сульфатидов не обязательно распространена при всех видах рака. Кроме того, поскольку липиды могут мигрировать между клеточной мембраной и сывороточной средой в клетках, культивируемых *in vitro*, необходимо выяснить, являются ли повышенные уровни сульфатидов артефактом в культивируемых линиях опухолевых клеток или это наблюдение справедливо и для условий *in vivo* [54].

Синтез церамид-1-фосфата. Церамид-1-фосфат (C1P) является сигнальной молекулой, функция которой антагонистична по отношению к Cer. Подобно сфингозин-1-фосфату (S1P), он является мощным ингибитором апоптоза и способствует выживанию клеток, стимулирует синтез ДНК и деление клеток.

C1P блокирует апоптоз, ингибируя либо кислую сфингомиелиназу (aSMase), либо каспазы и предотвращая фрагментацию ДНК в макрофагах. Он также ингибирует серинпальмитоилтрансферазу, ключевой регуляторный фермент в биосинтезе длинноцепочечных сфингоидных оснований и, следовательно, Cer.

S1P может высвобождаться повреждёнными клетками, присутствует в экзосомах, экспортируемых в плазму, поэтому способен взаимодействовать с особыми участками на плазматической мембране других клеток [55].

В реализации митогенного действия S1P на клетки участвуют разные сигнальные пути и ферменты, в том числе MEK/ERK1-2, NADPH-оксидазы, протеинкиназа C, PI3K/Akt/mTOR. Кроме активации пролиферации клеток, S1P увеличивает выживаемость клеток, тормозя сигнальные пути, связанные с апоптозом, стимулирует сигнальный путь PI3K/Akt и усиливает экспрессию индуцируемой NO-синтазы (iNOS) [8].

S1P образуется из Cer при помощи церамидкиназы (CerKase) (ген *CERK*). CerKase может быть ассоциирована с разными мембранами, включая самый отдалённый от ядра *транс*-Гольджи, эндосомы, плазматическую мембрану и митохондрии. Интерлейкин-1 β и ионы кальция активируют CerKase, образующийся S1P, в свою очередь, активирует фосфолипазу типа IVA A2 (сPLA2) в мембране аппарата Гольджи, способствует высвобождению арахидоновой кислоты и, таким образом, стимулирует синтез провоспалительных эйкозаноидов [56].

Разные типы клеток могут иметь различное субклеточное распределение CerKase, и экспрессия этого фермента не одинакова во всех типах клеток. Что касается регуляции активности, помимо способности фермента перемещаться внутриклеточно из одного компартмента в другой и зависимости его активности от катионов (в основном ионов Ca²⁺), есть предположения, что CerKase регулируется путём фосфорилирования/дефосфорилирования [57].

Во многих исследованиях показана высокая активность CerKase в опухолях, в том числе в клетках рака молочной железы [58], опухолей поджелудочной железы [59]. В опухолях молочной железы высокая экспрессия CerKase коррелирует с риском рецидивирования [60].

Синтез сфингозин-1-фосфата. S1P опосредует выживание и пролиферацию клеток [61]. Биологический эффект S1P может быть реализован двумя путями: молекула (1) экспортируется из клетки, вызывая паракринный (или аутокринный) эффект, или (2) может связываться с внутриклеточными мишенями [62]. S1P является заряженным липидом, и поэтому не может свободно диффундировать через мембрану. В транспорте молекулы участвуют низкоизбирательные АТФ-связывающие транспортные белки семейства ABC и высокоизбирательный белок SPNS2 семейства MFS [63]. С помощью SPNS2 транспор-

тируется не только S1P, но и дигидросфингозин-1-фосфат (DHS1P), при этом транспорт нефосфорилированных производных невозможен. Транспортная активность SPNS2 в отношении S1P увеличивается пропорционально количеству S1P внутри клетки, что говорит о механизме действия SPNS2 как пассивного транспортёра, который не требует какого-либо источника энергии и этим отличается от транспортёров ABC [64].

Концентрация S1P в плазме крови поддерживается на уровне 0,5–1 мкМ за счёт его синтеза эритроцитами, эндотелиальными клетками и печенью, которая синтезирует АроМ, физиологический переносчик S1P на липопротеины высокой плотности (ЛПВП). Концентрация S1P в интерстициальных жидкостях поддерживается на низком наномолярном уровне из-за высокой активности ферментов, расщепляющих S1P (например, сфингозин-1-фосфат лиаза S1PLase) [65].

S1P способен связываться с 5 мембранными рецепторами (S1PRs), принадлежащими к суперсемейству GPCR (табл. 4). Активируемые S1PR сигнальные пути регулируют развитие ЦНС и сердечно-сосудистой системы, репродуктивную функцию, миграцию клеток иммунной системы, адгезию, выживаемость и деление клеток, ответ на стресс и другие процессы. S1P также может регулировать клеточный ответ путём прямого связывания с некоторыми внутриклеточными мишенями, например, с гистондеацетилазами [66]. Подобно фактору роста эндотелия сосудов, S1P может увеличивать проницаемость сосудов за счёт активации рецептора S1P₂ и передачи сигнала через Rho/ROCK/PTEN [67]. S1P также может препятствовать апоптозу путём ингибирования транслокации цитохрома c и Smac/DIABLO 9 из митохондрий в цитоплазму [68].

S1P оказывает влияние на метастазирование, миграцию клеток, ангиогенез и лимфогенез. В активации ангиогенеза и лимфогенеза участвует как S1P, циркулирующий в кровотоке, так и вырабатываемый самой опухолью. Ponnusamy et al. [69] показали, что нейтрализация S1P в кровотоке с использованием антител приводит к подавлению развития метастазов в лёгких. На модели клеток карциномы печени было показано, что S1P может индуцировать метастазирование опухолевых клеток путём установления аутокринной петли MMP-7/синдекан-1/TGF- β 1 [1], а на модели клеток рака яичников было продемонстрировано, что S1P стимулирует хемотаксис и инвазию рецептор-зависимым образом, активируя ERK, AKT и p38 [70]. S1P регулирует способ-

Таблица 4. Рецепторы S1P [44]

Тип	Ген	G-белок	Локализация и функция
S1P ₁	<i>S1PR1</i>	G _{i/o}	экспрессируется нейронами головного мозга, клетками миокарда, селезёнки, почек, мышечной ткани, лейкоцитов, β-клеток островков Лангерганса поджелудочной железы; активация рецепторов S1P ₁ сопровождается замедлением инфильтрации В- и Т-лимфоцитов в ткани, созреванием Т-клеток; в ЦНС рецепторы S1P ₁ стимулируют миграцию нейрональных стволовых клеток; путём активации S1P ₁ регулируется пролиферация клеток эндотелия сосудов, а также формирование гладкомышечного слоя стенок сосудов; при участии рецепторов S1P ₁ регулируется секреция инсулина β-клетками поджелудочной железы
S1P ₂	<i>S1PR2</i>	G _{i/o} , G _q , G _{12/13}	экспрессируется нейронами головного мозга, клетками миокарда, селезёнки, лёгких, печени, почек, мышечной ткани, тимуса; через рецепторы S1P ₂ S1P регулирует пролиферацию эпителиальных клеток, повышает выживаемость кардиомиоцитов после ишемического/реперфузионного повреждения, пролиферацию гепатоцитов, стимулирует дегрануляцию тучных клеток; избыточная активация S1P ₂ -рецепторов приводит к аномальному усилению ангиогенеза
S1P ₃	<i>S1PR3</i>	G _{i/o} , G _q , G _{12/13}	экспрессируется нейронами головного мозга, клетками миокарда, селезёнки, лёгких, печени, почек, мышечной ткани, тестикул и тимуса; активация S1P ₃ -рецепторов стимулирует воспалительные реакции и свёртывание крови, повышает выживаемость кардиомиоцитов после ишемического/реперфузионного повреждения, регулирует восприятие острой механической боли
S1P ₄	<i>S1PR4</i>	G _{i/o} , G _{12/13}	экспрессируется в лейкоцитах и клетках лимфоидной ткани; активация S1P ₄ -рецепторов стимулирует миграцию Т-клеток и секрецию цитокинов
S1P ₅	<i>S1PR5</i>	G _q , G _{12/13}	экспрессируется в клетках головного мозга, селезёнки и кожи, NK-клетках; активация S1P ₅ -рецепторов в головном мозге ингибирует миграцию клеток-предшественников олигодендроцитов и повышает выживаемость олигодендроцитов

ность клеток к миграции путём перераспределения актина от фокальных контактов к складкам мембраны (ламеллоподиям). Стимуляция клеток MCF-7 S1P перераспределяет актин в складках мембраны и способствует миграции клеток, тогда как снижение уровня S1P восстанавливает контакты актинсодержащих фокусов адгезии и предотвращает миграцию клеток [66]. S1P стимулирует миграцию клеток MDA-MB-231 рака молочной железы и повышает их метастатическую активность [71].

S1P синтезируется непосредственно из сфингозина (Sph) при помощи сфингозинкиназ (SphKase), которые переносят остаток фосфорной кислоты от молекулы АТФ на гидроксильную группу C1 Sph. Sph, в свою очередь, как описано ниже, образуется преимущественно в процессе катаболизма SM под действием SMase и церамидазы (CERase) [44]. Два гена человека, *SPHK1* и *SPHK2*, кодируют

SphKase1 и SphKase2, каждая из которых обладает рядом сплайс-вариантов. Хотя SphKase1 и SphKase2 существенно различаются по размеру, они имеют высокую степень сходства полипептидных последовательностей, причём почти вся полипептидная последовательность SphKase1 совпадает с участками более крупного SphKase2. Однако N-концы двух белков различаются, и SphKase2 обладает богатой пролином полипептидной вставкой в центральной области своей последовательности, которая отличается от SphKase1 и от любого другого известного белка [72]. Характеристики SphKase организма человека представлены в табл. 5.

Во многих опухолях обнаружена повышенная активность SphKase1, что обуславливает повышение уровня S1P. Так, повышенная экспрессия транскрипта мРНК *SPHK1* и/или белка SphKase1 наблюдается при раке желудка,

Таблица 5. SphKase организма человека [73–76]

Фермент	Ген	Изоформы	Внутриклеточная локализация	Субстрат	Экспрессия
SphKase1	<i>SPHK1</i>	SphKase1a SphKase1b SphKase1c	преимущественно цитоплазма (способна перемещаться к плазматической мембране при активации пролиферативных сигнальных путей)	преимущественно Sph, в меньшей степени — сфинганин	все ткани; широко экспрессируется в печени, почках, сердце и скелетных мышцах у взрослых; экспрессируется в коре головного мозга (на уровне белка)
SphKase2	<i>SPHK2</i>	SphKase2a, SphKase2-S, SphKase2b/-L, SphKase2c, SphKase2d	преимущественно ядро и цитоплазма; перемещается в ER, митохондрии (зависит от типа клеток); ингибирует синтез ДНК и регулирует активность HDAC1/2	Sph, фитоSph и DhSph	в основном экспрессируется в почках, печени и мозге взрослых; экспрессируется в коре головного мозга и гиппокампе (на уровне белка)

Примечание. Названия изоформ, использованные в таблице, представлены согласно GenBank и Uniprot. Данные о количестве изоформ SphKase2 разнятся (5 или 7), не все из них подтверждены экспериментально.

лёгких, головного мозга, толстой кишки [77]. При этом метастатический рак толстой кишки имеет более высокую экспрессию *SPHK1*, чем неметастатическая форма [78]. Высокая опухолевая экспрессия *SPHK1* также коррелирует с плохой выживаемостью и индукцией устойчивости к тамоксифену у пациентов с эстрогенчувствительным раком молочной железы [66].

Функция SphKase2, по-видимому, более сложная. Ранние исследования показали, что избыточная экспрессия *SPHK2* приводит к подавлению роста клеток и усиливает апоптоз, предполагая, что, хотя и SphKase2, и SphKase1 используют один и тот же физиологический субстрат и генерируют один и тот же продукт, SphKase2 может играть роль, противоположную роли SphKase1. Эта проапоптотическая роль SphKase2 подтверждается более поздними исследованиями, демонстрирующими, что мезангиальные Sphk2^{-/-}-клетки мышей более устойчивы к апоптозу, индуцированному стауропорином, по сравнению с клетками дикого типа или Sphk1^{-/-}-клетками. Более того, подавление экспрессии эндогенной SphKase2 в клетках HEK293 блокирует апоптоз, индуцированный ФНО-α. Вместе с тем, однако, SphKase2 может играть антиапоптотическую роль: подавление экспрессии *SPHK2* или нацеливание на активность SphKase2 с помощью специфичных для изоформы ингибиторов может усиливать апоптоз и повышать чувствительность опухолевых клеток к химиотерапии [72].

СВЯЗЬ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ РАСПАДА СФИНГОЛИПИДОВ С ОПУХОЛЕВОЙ ПРОГРЕССИЕЙ

Распад цереброзидов. Продуктами реакции гидролиза цереброзидов являются церамиды и соответствующие моносахариды — галактоза или глюкоза. Эти реакции катализируются, соответственно, галактозилцерамидазой (GalCERase) и глюкозилцерамидазами (GluCERase) [44].

В ряде работ показано снижение активности GalCERase в опухолевых клетках, в том числе за счёт гипоэкспрессии гена *GALC*. Так, в литературе имеются данные о снижении экспрессии гена *GALC* при раке головы и шеи [39, 79], лёгких [79], носоглотки [80]. В исследованиях Zhao et al. [80] также было показано, что более высокая экспрессия *GALC* в клетках CNE-2Z снижала пролиферацию, миграцию клеток и способность к метастазированию по сравнению с контролем.

Причиной подавления транскрипции гена *GALC* может быть связывание ингибирующих факторов транскрипции с соответствующей промоторной областью. Ген *GALC* расположен на хромосоме 14q3 и имеет сигнальные последовательности, чувствительные к факторам транскрипции SP1 (5'-CCCGCC-3'), YY1 (5'-AAATGG-3') и AP2 (5'-GCCTGCAGGC-3') [81]. Из перечисленных выше факторов транскрипции наиболее

Таблица 6. GluCERase организма человека [86]

Фермент	Ген	Внутриклеточная локализация	Субстрат	Экспрессия
Кислая GluCERase	<i>GBA1</i>	лизосомальная мембрана	GluCer; GluSph	все ткани
Нелизосомальная GluCERase	<i>GBA2</i>	ER, Гольджи, плазматическая мембрана	конъюгаты желчных кислот; GluCer	мозг, сердце, скелетные мышцы, почки и плацента
Цитоплазматическая GluCERase	<i>GBA3</i>	цитоплазма	флавоноидные гликозиды; C6-NBD-GlcCer	печень, тонкая кишка, селезёнка, почки

Таблица 7. SMase организма человека [87–93]

Фермент	Ген	Внутриклеточная локализация	Субстрат	Экспрессия
Кислая SMase	<i>SMPD1</i>	лизосомы, мембранные рафты; цитоплазма (стимулированная секреция)	Sph, фосфатидилхолин, фосфатидилглицерол	повсеместно
Нейтральная SMase	<i>SMPD2</i>	плазматическая мембрана, мембраны ER, аппарата Гольджи и ядра	Sph, лизофосфатидилхолин	повсеместно
Щелочная SMase	<i>ENPP7</i>	плазматическая мембрана, мембрана энтероцитов тонкой кишки	Sph, лизофосфатидилхолин, фактор активации тромбоцитов	обнаруживается в толстой кишке (на уровне белка); экспрессируется в двенадцатиперстной кишке, тощей кишке и печени; на низких уровнях — в подвздошной кишке; очень низкая экспрессия — в пищеводе, желудке и толстой кишке

вероятным ингибитором представляется YY1, роль которого в подавлении транскрипции ряда генов уже описана в литературе [39]. Так, в работах Sui et al. [82] и Yakovleva et al. [83] описано ингибирующее действие YY1 на транскрипцию гена, кодирующего p53. Другим возможным механизмом подавления транскрипции гена *GALC* является гиперметилирование промоторного участка гена [79].

Недавние исследования показали, что GalCERase может оказывать и противоположное влияние на рост и дифференцировку опухолей. Это ставит под сомнение однозначную оценку его вклада в метаболизм сфинголипидов в раковых клетках и его роль в прогрессировании опухоли [84, 85]. Так, Belleri et al. [85] в экспериментах на клетках меланомы мыши B16-F10 и человека A2058 показали, что подавление GalCERase приводило к активации *SMPD3*, который кодирует SMase, образующую Cer, что в итоге приводило к повышению

уровня Cer и торможению роста, подвижности, инвазивной способности клеток меланомы, а также метастатической активности клеток B16-F10 при трансплантации сингенным мышам или эмбрионам *Danio rerio*. Активация GalCERase оказывала противоположное действие. В подтверждение полученных результатов авторы приводят данные о прогрессивном увеличении экспрессии *GALC* в образцах кожи человека от обыкновенных невусов до меланомы стадии IV с пропорциональным снижением уровня *SMPD3* и Cer.

Вклад GluCERase (табл. 6) в рост, пролиферацию и метастазирование опухолевых клеток существенно ниже, чем GalCERase.

В литературе встречаются упоминания, что болезнь Гоше, развитие которой связано с дефицитом GluCERase, коррелирует со случаями миеломной болезни, лейкозов, глиобластомы, рака лёгких и гепатоцеллюлярной карциномы, хотя причины корреляции в на-

стоящее время окончательно не ясны. Однако только часть исследователей связывает развитие указанных опухолей с дефицитом самого фермента, а другая часть — с терапией, применяемой при болезни Гоше [86].

Распад сфингомиелинов. Ключевые ферменты катаболизма сфингомиелинов — сфингомиелиназы (SMase) — принадлежат к семейству фосфодиэстераз, схожих по механизму катализа с фосфолипазами C. Под действием SMase из SM образуются Cer и фосфохолин. Охарактеризованы несколько различных изоформ SMase человека, отличающихся оптимумом pH и, следовательно, локализацией в клетке; кроме того, существуют Mg^{2+} - или Zn^{2+} -зависимые формы и соответственно формы независимые от этих ионов (табл. 7) [44, 87, 88].

Основной механизм противоопухолевой активности SMase связан с их участием в образовании Cer, обладающего способностью подавлять пролиферацию опухолевых клеток. Высокая активность SMase приводит к повышению уровня Cer, а снижение активности — к его уменьшению. Изменение активности SMase также влияет на структуру и функции мембран. Около 70% всей клеточной SMase расположено в липидных рафтах. Расщепление под действием SMase сфингомиелинов плазматической мембраны увеличивает текучесть мембраны и влияет на распределение холестерина в клетках, в частности, образующийся Cer вытесняет холестерин из мембранных рафтов [87, 94]. Кислая SMase, полученная из тромбоцитов, вовлечена в стимуляцию клеточной адгезии и метастазирования меланомы. Кроме того, предполагается, что в эндотелиальных клетках фермент играет ключевую роль в опухолевом ангиогенезе, поскольку было показано, что SMase опосредует чувствительность к антиангиогенной терапии путём повышения уровня Cer [95].

Роль SMase в апоптотической гибели опухолевых клеток была доказана ещё в 1994 г., когда Jarvis et al. [96] сообщили о Cer-индуцированном апоптозе в лейкозных клеточных линиях человека, включая HL-60 и U937, и мышинной фибросаркомы L929/LM и WENI 164/13, вызванном активацией SMase под действием ФНО- α .

В ряде работ продемонстрировано снижение активности SMase в опухолевых клетках. Эпигенетический анализ показал, что ген нейтральной SMase (nSMase) гиперметилирован и, следовательно, экспрессия его снижена в клеточных линиях рака молочной железы [89], тройного негативного рака молочной железы MDA-MB-231 [87], гепатоцеллюлярной кар-

циномы [91]. В клеточной линии MCF7 указанный ген не был гиперметилирован, однако активность nSMase была снижена, из чего авторы делают вывод, что экспрессия данного гена в этих клетках регулируется иным способом, например, прямым действием на ацетилирование гистонов [90]. Помимо работ по изучению экспрессии генов, кодирующих SMase, имеются исследования, косвенно доказывающие изменение активности SMase в опухолевых клетках. Так, Kim et al. [92] идентифицировали точечные мутации в гене, кодирующем nSMase2, в 5% образцов острых миелобластных лейкозов и 6% образцов острых лимфобластных лейкозов. Хотя функциональные последствия большинства из них остаются неясными, две из мутаций привели к снижению стабильности и неправильной локализации фермента. В этом же исследовании была показана делеция в гене, кодирующем nSMase, в клетках остеосаркомы мыши F4328.

Механизм действия ряда противоопухолевых агентов включает активацию SMase. Так, в работе Aslan et al. [97] было показано, что тимохинон индуцирует апоптоз SMase в клетках рака молочной железы MCF-7 и HepG2 путём активации nSMase и связанного с этим повышения уровня Cer. Аналогичный механизм Cer-индуцированного апоптоза в клетках LA-N-5 нейробластомы человека за счёт активации nSMase под действием стауропорина описан в работе Kilkus et al. [98]. В работе Rotolo et al. [99] было показано, что обработка клеток Jurkat УФ-светом приводит к переносу секреторной формы aSMase в липидный микродомен и образованию платформ, богатых Cer, что активирует апоптоз. Ferranti et al. [100] показали, что активация и секреция aSMase под действием УФ-света происходит посредством кальций-зависимого слияния лизосом с плазматической мембраной. В работе Clarke et al. [101] было показано, что противоопухолевое действие доксорубина связано с активацией промотора гена *SMPD2*, что активирует синтез фермента и увеличивает количество Cer. Активность SMase зависит от многих факторов и усиливается под действием ФНО- α , 1,25-дигидрокси-кальциферола, интерферона гамма (ИФН γ), фактора роста нервов, нагревания, ионизирующего облучения, фенретионида, арабинозилцитозина [45, 102].

Распад церамидов. Избыточное количество Cer опасно для клетки, поэтому они быстро гидролизуются при участии CERase (табл. 8). Продуктами реакции гидролиза являются свободный аминоксипит (Sph и его аналоги),

Таблица 8. CERase организма человека [103, 106]

Фермент	Ген	Внутриклеточная локализация	Субстрат	Экспрессия
Кислая CERase	<i>ASAH1</i>	лизосомы	ненасыщенные церамиды с остатками жирных кислот с 6–16 атомами С	преимущественно в сердце и почках
Нейтральная CERase	<i>ASAH2</i>	аппарат Гольджи и внутренняя сторона цитоплазматической мембраны	преимущественно церамиды с остатками жирных кислот с 16–18 атомами С	преимущественно в клетках эпителия почечных канальцев, тонкой и толстой кишки, в гепатоцитах
Щелочные CERase	<i>ACER1-3</i>	ER, аппарат Гольджи	Сег с ненасыщенной очень длинной ацильной цепью	<i>ACER1</i> – преимущественно кожа; <i>ACER2</i> – преимущественно плацента; <i>ACER3</i> – повсеместно

а также свободные жирные кислоты. Катаболизм Сег при помощи CERase – единственный способ получения свободного Sph в клетке. Он (как и другие сфингоидные основания) может выходить из лизосомы и повторно использоваться для синтеза Сег при помощи CERSase либо фосфорилироваться с образованием S1P [44, 103, 104].

Снижение уровня эндогенных Сег и активация синтеза S1P, опосредованные высокой активностью CERase, переводят сфинголипидный баланс в состояние, способствующее выживанию клеток [105].

Из разных типов CERase основную роль в развитии и прогрессировании рака играет кислая CERase (aCERase). Она высоко экспрессируется в солидных опухолях предстательной железы, меланомы и молочной железы, а также при лейкозах [105]. Вместе с тем в других исследованиях показано снижение уровня aCERase в клетках опухолей щитовидной железы [106].

Высокая активность кислой CERase и обусловленное этим снижение уровня Сег могут быть причиной устойчивости к химиотерапии. Так, снижение уровня Сег, обусловленное гиперэкспрессией *ASAH1*, связывают с резистентностью к цисплатину [107].

Распад сульфатидов. Дегградация сульфатидов опосредуется лизосомальной арилсульфатазой А.

Семейство ARSase человека состоит из 11 членов: А, В, С, D, E, F, G, H, I, J и K. ARSase человека А (ARSaseA) и В (ARSaseB) присутствуют в лизосомах, ARSaseC является микросомальным белком, а арилсульфатазы D, F, H, J и K локализованы в мембране ER.

ARSaseE присутствует в аппарате Гольджи. ARSaseG встречается как в ER, так и в лизосомах. ARSaseI содержится в ER, но также может секретироваться во внеклеточную среду. Все члены семейства имеют 20–60% аминокислотную гомологию [108].

Действие ARSaseA реализуется при участии сапозина В (SapB), который извлекает сульфатиды из мембран и тем самым делает его доступным для ARSaseA. Альтернативный сульфатазо-независимый путь дегградации сульфатида был показан в клеточной линии нейробластомы, где наблюдалась прямая генерация Сег из сульфатида без предварительного десульфатирования [109].

Накопление сульфатидов при недостатке ARSaseA или мутации в гене, кодирующем SapB, связаны с демиелинизацией и метахроматической лейкодиistroфией, смертельным неврологическим заболеванием. В целом, накопленные данные указывают на то, что изменение синтеза сульфатидов оказывает значительное влияние на генерацию нейрональных дефектов [51].

ARSase активно используется в экспериментах по изучению роли сульфатидов в метастазировании. Так, в адгезии *in vitro* активированных тромбоцитов, экспрессирующих Р-селектин к клеткам MC38 рака толстой кишки мыши, участвуют исключительно продуцируемые этими клетками сульфатиды. Взаимодействие с тромбоцитами наблюдалось *in vivo* после того, как клетки MC38 трансплантировали мышам: уже через 30 мин после внутривенного введения опухолевых клеток обнаруживались их агрегаты с тромбоцитами. На специфический вклад сульфатидов

Таблица 9. Основные ферменты, участвующие в деградации S1P [44, 116]

Фермент	Ген	Внутриклеточная локализация	Субстрат	Экспрессия
S1Pase 1	<i>SGPP1</i>	мембрана ER	S1P, DhS1P и фитоS1P	повсеместно
S1Pase 2	<i>SGPP2</i>	мембрана ER	S1P, DhS1P	сильно выражена в почках и сердце; менее выражена в головном мозге, толстой и тонкой кишке, лёгких
S1PLase	<i>SGPL1</i>	мембрана ER	S1P	повсеместно; высокие уровни обнаружены в печени, тонкой кишке и тимусе; более низкие — в почках, лёгких, миокарде, селезёнке и головном мозге; обнаружена в желудке, яичках и скелетных мышцах
Лизофосфолипид фосфатаза 3	<i>PLPP3</i>	плазматическая мембрана, ER, мембрана аппарата Гольджи	лизофосфатидные кислоты, фосфатидные кислоты, S1P, C1P, пирогосфат диацилглицерола и др.	повсеместно; высокие уровни — в миокарде и плаценте

в образование агрегатов клетками рака толстой кишки указывают контрольные эксперименты, в которых было показано, что клетки MC38, обработанные ARSase для удаления сульфатных групп, теряют способность к метастазированию [53].

ARSaseA используется для десульфатирования; так, для клеток карциномы толстой кишки мыши MC38 метаболическое ингибирование сульфатирования путём обработки клеток ARSaseA приводит к снижению связывания Р-селектина, что, в свою очередь, подавляет развитие метастазов в лёгких мышечей. Высокая концентрация сульфатидов на поверхности раковых клеток, возможно, служит лигандом для Р-селектина, способствуя распространению метастазов. Связь между механизмами опухолевой прогрессии и повышенной экспрессией сульфатида остаётся пока неизвестной [110, 111].

Распад церамид-1-фосфата. Дефосфорилирование C1P может осуществляться под действием ряда фосфатаз. C1P-фосфатаза катализирует отщепление остатка фосфорной кислоты от C1P с образованием церамида. C1P-фосфатаза, которой богаты синапсомы мозга и фракции плазматической мембраны печени, по-видимому, отличается от фосфатазы, которая гидролизует фосфатидную кислоту (PA), PA-фосфогидролазы. Тем не менее

C1P также может быть преобразован в церамид под действием PA-фосфогидролазы, которая расположена в плазматической мембране клеток. Этот фермент принадлежит к семейству, состоящему по крайней мере из трёх фосфатаз млекопитающих, расщепляющих фосфаты разных липидов (LPP). LPP регулируют выживаемость клеток, контролируя уровни внутриклеточного пула PA и S1P, а также регулируют инфильтрацию лейкоцитов и воспаление дыхательных путей. Дефосфорилирование C1P является способом ослабления/инактивации его регуляторных эффектов, хотя образованный в результате церамид потенциально может нанести вред клеткам. Контроль уровней церамида и C1P скоординированным действием CerKase и C1P-фосфатазы может иметь решающее значение для метаболических или сигнальных путей, которые регулируются этими двумя сфинголипидами [112–115].

Распад сфингозин-1-фосфата. Катаболизм S1P внутри клеток происходит при помощи фосфатаз и лиазы сфингозин-1-фосфата (S1Pase и S1PLase соответственно) (табл. 9) [116].

S1Pase имеют высокую гомологию и вместе составляют семейство SPP. Члены семейства SPP обладают достаточно узкой субстратной специфичностью и дефосфорилируют только S1P, DhS1P и фитоS1P. Они являются интегральными мембранными белками, лока-

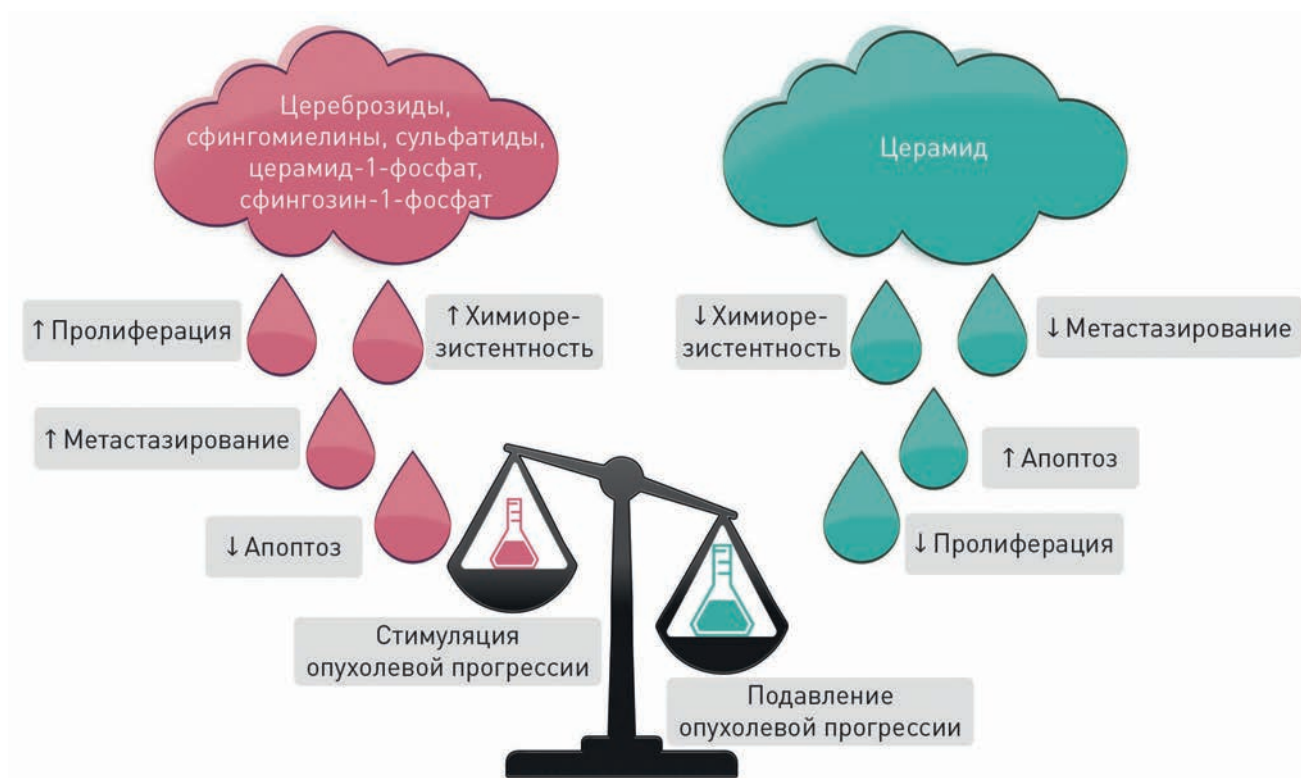


Рис. 3. Вклад различных сфинголипидов в стимуляцию и подавление опухолевой прогрессии

лизованными в ER, участвуют в регуляции внутриклеточных концентраций S1P и могут пополнять пул свободного Sph в клетке [44, 116].

Избыток S1P в плазме крови расщепляется на плазматической мембране гепатоцитов лизофосфолипидфосфатазой 3, относящейся к семейству LPP [44, 116].

Под действием другого фермента, S1PLase, S1P распадается на этаноламин-1-фосфат и альдегид C16 (гексадеценаль). В условиях живой клетки реакция, катализируемая S1PLase, фактически необратима, поэтому катаболизм S1P по этому пути является внутриклеточным механизмом элиминации сфинголипидов [42].

Показано, что S1PLase участвует в пролиферации клеток как через GPR55-зависимый, так и через GPR55-независимый пути [117]. Несмотря на наблюдения изменённых уровней экспрессии S1PLase в опухолевых тканях человека, роль S1PLase в патогенезе рака ещё не полностью выяснена [117]. Так, активность S1PLase повышена во многих опухолевых клетках, в частности, при раке яичников [118]. В клетках гепатоцеллюлярной карциномы [119] и рака толстой кишки [120], несмотря на повышенную активность SphKase, уровень S1P не был увеличен или даже частично снижался. Вероятнее всего, это связано с повышенной активностью S1PLase, утилизи-

рующей образующийся S1P [117]. При этом в других исследованиях было показано, что активность S1PLase была понижена при раке толстой кишки [121].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сфингозин-1-фосфат, церамид-1-фосфат, церамид, диацилглицерол и другие сфинголипиды — основные участники сфинголипидного цикла, нарушение баланса которого может привести к гибели или неконтролируемой пролиферации клетки (рис. 3). Действие церамида, как правило, опосредует остановку или торможение клеточного цикла или гибель клеток в ответ на клеточный стресс, тогда как сфингозин-1-фосфат, церамид-1-фосфат, сфингомиелины, цереброзиды и сульфатиды отвечают за выживание и пролиферацию клеток. Взаимопревращение этих метаболитов под действием ряда важнейших ферментов обеспечивает возможность тонкой внутриклеточной регуляции.

На основании анализа существующих данных можно сформулировать следующие основные особенности метаболизма сфинголипидов в опухолевых клетках.

- Для опухолевых клеток, в целом, характерно снижение содержания ферментов,

участвующих в синтезе Cer, и их пониженная активность, а также повышение содержания фосфорилированных Cer, Sph и их производных. Это обеспечивает благоприятные условия для пролиферации опухолевых клеток и повышает их выживаемость.

- Для отдельных типов опухолевых клеток наблюдается повышенное содержание сульфатидов на поверхности мембран, что способствует развитию и распространению метастазов.
- Большинство опухолевых клеток характеризуется повышенным содержанием S1P и C1P; высокая концентрация этих фосфатов способствует активации клеточной пролиферации, стимулирует метастазирование. В случае с S1P — во многом благодаря активации ангиогенеза.
- Изменение баланса DhCer/Cer в пользу первого приводит к активной клеточной пролиферации и развитию метастазов во многих типах опухолей. Изменение баланса в пользу Cer оказывает противоположный эффект.
- Для всех опухолевых клеток изменение состава клеточной мембраны как результат деградации обычных липидов приводит к перестройке отдельных участков мембраны, включая рафты, что ведёт к «выпадению» из мембраны специфических рецепторов. Такого рода перестройки приводят к ингибированию апоптоза и активной пролиферации.

Очевидно, что структуры сфинголипидов очень сложны и разнообразны, так же, как и спектр их функций. Развитие липидомики и биоаналитических технологий с каждым днём расширяет наши представления об этом классе соединений и их производных, хотя по-прежнему отсутствуют чёткие представ-

ления о роли отдельных молекул и механизме их участия в опухолевой прогрессии. С одной стороны, многое известно о синтезе и распаде сфинголипидов, с другой — полное понимание способов регуляции всё ещё не сформировано. Экспериментальная работа в этой области ведёт к открытию новых изоформ уже известных ферментов, участвующих в синтезе и распаде сфинголипидов. Открытие белков-переносчиков сфинголипидов объяснило современную модель невезикулярного транспорта этих молекул. Эти белки, вероятно, являются лишь первыми представителями большого класса белков-переносчиков сфинголипидов, регулирующих транспорт в определённые клеточные компартменты, и их участие в регуляции может оказаться чрезвычайно существенным. Требуется активная исследовательская работа, чтобы понять, как согласуются действия различных ферментов и транспортных белков, что определяет сфинголипидный состав плазматической мембраны и субклеточных оргanelл, какие факторы вызывают дисбаланс и приводят к развитию и прогрессии опухолей.

Вклад авторов. В.С. Покровский — концепция и руководство работой, редактирование текста статьи; В.И. Иванова-Радкевич, О.М. Кузнецова — написание текста статьи, редактирование текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена в рамках госзадания РУДН Министерства образования и науки № 075-01551-23-00 (FSSF-2023-0006).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Для подготовки настоящей статьи не проводились какие-либо исследования с участием людей или животных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Li, R. Z., Wang, X. R., Wang, J., Xie, C., Wang, X. X., Pan, H. D., Meng, W. Y., Liang, T. L., Li, J. X., Yan, P. Y., Wu, Q. B., Liu, L., Yao, X. J., and Leung, E. L. (2022) The key role of Sphingolipid metabolism in cancer: New therapeutic targets, diagnostic and prognostic values, and anti-tumor immunotherapy resistance, *Front. Oncol.*, **27**, 941643, doi: 10.3389/fonc.2022.941643.
2. Lin, M., Li, Y., Wang, S., Cao, B., Li, C., and Li, G. (2022) Sphingolipid metabolism and signaling in lung cancer: a potential therapeutic target, *J. Oncol.*, **28**, 9099612, doi: 10.1155/2022/9099612.
3. Pal, P., Atilla-Gokcumen, G.E., and Frasor, J. (2022) Emerging roles of ceramides in breast cancer biology and therapy, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 11178, doi: 10.3390/ijms231911178.
4. Pherez-Farah, A., López-Sánchez, R. D. C., Villela-Martínez, L. M., Ortiz-López, R., Beltrán, B. E., and Hernández-Hernández, J. A. (2022) Sphingolipids and lymphomas: a double-edged sword, *Cancers (Basel)*, **14**, 2051, doi: 10.3390/cancers14092051.
5. Byrne, F. L., Olzomer, E. M., Lolies, N., Hoehn, K. L., and Wegner, M. S. (2022) Update on glycosphingolipids abundance in hepatocellular car-

- cinoma, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 4477, doi: 10.3390/ijms23094477.
6. Zaibaq, F., Dowdy, T., and Larion, M. (2022) Targeting the sphingolipid rheostat in gliomas, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 9255, doi: 10.3390/ijms23169255.
 7. Sukocheva, O. A., Furuya, H., Ng, M. L., Friedemann, M., Menschikowski, M., Tarasov, V. V., Chubarev, V. N., Klochov, S. G., Neganova, M. E., Mangoni, A. A., Aliev, G., and Bishayee, A. (2020) Sphingosine kinase and sphingosine-1-phosphate receptor signaling pathway in inflammatory gastrointestinal disease and cancers: a novel therapeutic target, *Pharmacol. Ther.*, **207**, 107464, doi: 10.1016/j.pharmthera.2019.107464.
 8. Camacho, L., Ouro, A., Gomez-Larrauri, A., Carracedo, A., and Gomez-Muñoz, A. (2022) Implication of ceramide kinase/C1P in cancer development and progression, *Cancers (Basel)*, **14**, 227, doi: 10.3390/cancers14010227.
 9. Belleri, M., Chioldelli, P., Corli, M., Capra, M., and Presta, M. (2022) Oncosuppressive and oncogenic activity of the sphingolipid-metabolizing enzyme β -galactosylceramidase, *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer*, **1877**, 188675, doi: 10.1016/j.bbcan.2021.188675.
 10. Ogretmen, B. (2017) Sphingolipid metabolism in cancer signalling and therapy, *Nat. Rev. Cancer*, **18**, 33–50, doi: 10.1038/nrc.2017.96
 11. Zelnik, I. D., Rozman, B., Rosenfeld-Gur, E., Bendor, S., and Futerman, A. H. (2019) A stroll down the CerS lane, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **1159**, 49–63, doi: 10.1007/978-3-030-21162-2_4.
 12. Stiban, J., Tidhar, R., and Futerman, A. H. (2010) Ceramide synthases: roles in cell physiology and signaling, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **688**, 60–71, doi: 10.1007/978-1-4419-6741-1_4.
 13. Stiban, J., Fistere, D., and Colombini, M. (2006) Dihydroceramide hinders ceramide channel formation: implications on apoptosis, *Apoptosis*, **11**, 773–780, doi: 10.1007/s10495-006-5882-8.
 14. Lachkar, F., Ferré, P., Foufelle, F., and Papaioannou, A. (2021) Dihydroceramides: their emerging physiological roles and functions in cancer and metabolic diseases, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **320**, E122–E130, doi: 10.1152/ajpendo.00330.2020.
 15. Zheng, W., Kollmeyer, J., Symolon, H., Momin, A., Munter, E., Wang, E., Kelly, S., Allegood, J. C., Liu, Y., Peng, Q., Ramaraju, H., Sullards, M. C., Cabot, M., and Merrill, A. H., Jr (2006) Ceramides and other bioactive sphingolipid backbones in health and disease: lipidomic analysis, metabolism and roles in membrane structure, dynamics, signaling and autophagy, *Biochim. Biophys. Acta*, **1758**, 1864–1884, doi: 10.1016/j.bbamem.2006.08.009.
 16. Breen, P., Joseph, N., Thompson, K., Kraveka, J. M., Gudiz, T. I., Li, L., Rahmaniyan, M., Bielawski, J., Pierce, J. S., Van Buren, E., Bhatti, G., and Separovic, D. (2013) Dihydroceramide desaturase knockdown impacts sphingolipids and apoptosis after photodamage in human head and neck squamous carcinoma cells, *Anticancer Res.*, **33**, 77–84.
 17. Casasampere, M., Ordoñez, Y. F., Pou, A., and Casas, J. (2016) Inhibitors of dihydroceramide desaturase 1: therapeutic agents and pharmacological tools to decipher the role of dihydroceramides in cell biology, *Chem. Phys. Lipids*, **197**, 33–44, doi: 10.1016/j.chemphyslip.2015.07.025.
 18. Guo, W., Zhang, C., Feng, P., Li, M., Wang, X., Xia, Y., Chen, D., and Li, J. (2021) M6A methylation of DEGS2, a key ceramide-synthesizing enzyme, is involved in colorectal cancer progression through ceramide synthesis, *Oncogene*, **40**, 5913–5924, doi: 10.1038/s41388-021-01987-z.
 19. Hernández-Tiedra, S., Fabriàs, G., Dávila, D., Salanueva, Í. J., Casas, J., Montes, L. R., Antón, Z., García-Taboada, E., Salazar-Roa, M., Lorente, M., Nylandsted, J., Armstrong, J., López-Valero, I., McKee, C. S., Serrano-Puebla, A., García-López, R., González-Martínez, J., Abad, J. L., Hanada, K., Boya, P., and Velasco, G. (2016) Dihydroceramide accumulation mediates cytotoxic autophagy of cancer cells via autolysosome destabilization, *Autophagy*, **12**, 2213–2229, doi: 10.1080/15548627.2016.1213927.
 20. Grassme, H., Jekle, A., Riehle, A., Schwarz, H., Berger, J., Sandhoff, K., Kolesnick, R., and Gulbins, E. (2001). CD95 signaling via ceramide-rich membrane rafts, *J. Biol. Chem.*, **276**, 20589–20596, doi: 10.1074/jbc.M101207200.
 21. Crivelli, S. M., Giovagnoni, C., Zhu, Z., Tripathi, P., Elsherbini, A., Quadri, Z., Pu, J., Zhang, L., Ferko, B., Berkes, D., Spassieva, S. D., Martinez-Martinez, P., and Bieberich, E. (2022) Function of ceramide transfer protein for biogenesis and sphingolipid composition of extracellular vesicles, *J. Extracell. Vesicles*, **11**, e12233, doi: 10.1002/jev2.12233.
 22. Giussani, P., Colleoni, T., Brioschi, L., Bassi, R., Hanada, K., Tettamanti, G., Riboni, L., and Viani, P. (2008) Ceramide traffic in C6 glioma cells: evidence for CERT-dependent and independent transport from ER to the Golgi apparatus, *Biochim. Biophys. Acta*, **1781**, 40–51, doi: 10.1016/j.bbalip.2007.11.002.
 23. Chen, W., Wu, C., Chen, Y., Guo, Y., Qiu, L., Liu, Z., Sun, H., Chen, S., An, Z., Zhang, Z., Li, Y., and Li, L. (2021) Downregulation of ceramide synthase 1 promotes oral cancer through endoplasmic reticulum stress, *Int. J. Oral Sci.*, **13**, 10, doi: 10.1038/s41368-021-00118-4.
 24. Fekry, B., Jeffries, K. A., Esmaeilniakooshkghazi, A., Ogretmen, B., Krupenko, S. A., and Krupenko, N. I. (2016) CerS6 is a novel transcriptional target of p53 protein activated by non-genotoxic stress, *J. Biol. Chem.*, **291**, 16586–16596, doi: 10.1074/jbc.M116.716902.
 25. White-Gilbertson, S., Mullen, T., Senkal, C., Lu, P., Ogretmen, B., Obeid, L., and Voelkel-Johnson, C.

- (2009) Ceramide synthase 6 modulates TRAIL sensitivity and nuclear translocation of active caspase-3 in colon cancer cells, *Oncogene*, **28**, 1132-1141, doi: 10.1038/onc.2008.468.
26. Jensen, S. A., Calvert, A. E., Volpert, G., Kouri, F. M., Hurley, L. A., Luciano, J. P., Wu, Y., Chalastanis, A., Futerman, A. H., and Stegh, A. H. (2014) Bcl2L13 is a ceramide synthase inhibitor in glioblastoma, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **111**, 5682-5687, doi: 10.1073/pnas.1316700111.
 27. Chen, H., He, B., and Ke, F. (2022) Ceramide synthase 6 mediates triple-negative breast cancer response to chemotherapy through RhoA- and EGFR-mediated signaling pathways, *J. Breast Cancer*, **25**, 500-512, doi: 10.4048/jbc.2022.25.e47.
 28. Senkal, C. E., Ponnusamy, S., Manevich, Y., Meyers-Needham, M., Saddoughi, S. A., Mukhopadhyay, A., Dent, P., Bielawski, J., and Ogretmen, B. (2011) Alteration of ceramide synthase 6/C16-ceramide induces activating transcription factor 6-mediated endoplasmic reticulum (ER) stress and apoptosis via perturbation of cellular Ca^{2+} and ER/Golgi membrane network, *J. Biol. Chem.*, **286**, 42446-42458, doi: 10.1074/jbc.M111.287383.
 29. Schiffmann, S., Sandner, J., Birod, K., Wobst, I., Angioni, C., Ruckhäberle, E., Kaufmann, M., Ackermann, H., Lötsch, J., Schmidt, H., Geisslinger, G., and Grösch, S. (2009). Ceramide synthases and ceramide levels are increased in breast cancer tissue, *Carcinogenesis*, **30**, 745-752, doi: 10.1093/carcin/bgp061.
 30. Karahatay, S., Thomas, K., Koybasi, S., Senkal, C. E., Elojeimy, S., Liu, X., Bielawski, J., Day, T. A., Gillespie, M. B., Sinha, D., Norris, J. S., Hannun, Y. A., and Ogretmen, B. (2007) Clinical relevance of ceramide metabolism in the pathogenesis of human head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC): attenuation of C(18)-ceramide in HNSCC tumors correlates with lymphovascular invasion and nodal metastasis, *Cancer Lett.*, **256**, 101-111, doi: 10.1016/j.canlet.2007.06.003.
 31. Tallima, H., Azzazy, H. M. E., and El Ridi, R. (2021) Cell surface sphingomyelin: key role in cancer initiation, progression, and immune evasion, *Lipids Health Dis.*, **20**, 150, doi: 10.1186/s12944-021-01581-y.
 32. Jing, F., Jing, C., Dai, X., Zhou, G., Di, S., Bi, X., Dai, T., Qin, T., and Hong, L. (2021) Sphingomyelin synthase 2 but not sphingomyelin synthase 1 is upregulated in ovarian cancer and involved in migration, growth, and survival via different mechanisms, *Am. J. Transl. Res.*, **13**, 4412-4421.
 33. Zheng, K., Chen, Z., Feng, H., Chen, Y., Zhang, C., Yu, J., Luo, Y., Zhao, L., Jiang, X., and Shi, F. (2019) Sphingomyelin synthase 2 promotes an aggressive breast cancer phenotype by disrupting the homeostasis of ceramide and sphingomyelin, *Cell Death Dis.*, **10**, 157, doi: 10.1038/s41419-019-1303-0.
 34. Dahiya, R., Boyle, B., Goldberg, B. C., Yoon, W. H., Konety, B., Chen, K., Yen, T. S., Blumenfeld, W., and Narayan, P. (1992) Metastasis-associated alterations in phospholipids and fatty acids of human prostatic adenocarcinoma cell lines, *Biochem. Cell Biol.*, **70**, 548-554, doi: 10.1139/o92-085.
 35. Li, Z., Hailemariam, T. K., Zhou, H., Li, Y., Duckworth, D. C., Peake, D. A., Zhang, Y., Kuo, M. S., Cao, G., and Jiang, X. C. (2007) Inhibition of sphingomyelin synthase (SMS) affects intracellular sphingomyelin accumulation and plasma membrane lipid organization, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids*, **1771**, 1186-1194, doi: 10.1016/j.bbalip.2007.05.007.
 36. Tafesse, F. G., Huitema, K., Hermansson, M., van der Poel, S., van den Dikkenberg, J., Uphoff, A., Somerharju, P., and Holthuis, J. C. (2007) Both sphingomyelin synthases SMS1 and SMS2 are required for sphingomyelin homeostasis and growth in human HeLa cells, *J. Biol. Chem.*, **282**, 17537-17547, doi: 10.1074/jbc.M702423200.
 37. Van der Luit, A. H., Budde, M., Zerp, S., Caan, W., Klarenbeek, J. B., Verheij, M., and Van Blitterswijk, W. J. (2007) Resistance to alkyl-lysophospholipid-induced apoptosis due to downregulated Sphingomyelin synthase 1 expression with consequent Sphingomyelin- and cholesterol-deficiency in lipid rafts, *Biochem. J.*, **401**, 541-549, doi: 10.1042/BJ20061178.
 38. Itoh, M., Kitano, T., Watanabe, M., Kondo, T., Yabu, T., Taguchi, Y., Iwai, K., Tashima, M., Uchiyama, T., and Okazaki, T. (2003) Possible role of ceramide as an indicator of chemoresistance: decrease of the ceramide content via activation of glucosylceramide synthase and Sphingomyelin synthase in chemoresistant leukemia, *Clin. Cancer Res.*, **9**, 415-423.
 39. Beier, U. H., and Görögh, T. (2005) Implications of galactocerebrosidase and galactosylceramide metabolism in cancer cells, *Int. J. Cancer*, **115**, 6-10, doi: 10.1002/ijc.20851.
 40. Reza, S., Ugorski, M., and Suchański, J. (2021) Glucosylceramide and galactosylceramide, small glycosphingolipids with significant impact on health and disease, *Glycobiology*, **31**, 1416-1434, doi: 10.1093/glycob/cwab046.
 41. García-Barros, M., Coant, N., Truman, J. P., Snider, A. J., and Hannun, Y. A. (2014) Sphingolipids in colon cancer, *Biochim. Biophys. Acta*, **1841**, 773-782, doi: 10.1016/j.bbalip.2013.09.007.
 42. Liu, Y. Y., Gupta, V., Patwardhan, G. A., Bhinge, K., Zhao, Y., Bao, J., Mehendale, H., Cabot, M. C., Li, Y. T., and Jazwinski, S. M. (2010) Glucosylceramide synthase upregulates *MDR1* expression in the regulation of cancer drug resistance through *cSrc* and beta-catenin signaling, *Mol. Cancer*, **9**, 145, doi: 10.1186/1476-4598-9-145.
 43. Joshi, P. G., and Mishra, S. (1992) Galactocerebroside mediates Ca^{2+} signaling in cultured glioma cells,

- Brain Res.*, **597**, 108-113, doi: 10.1016/0006-8993(92)91511-c.
44. Покровский В. С. (2023) Биохимия человека. Обмен липидов: учебное пособие, Москва, Е-нот, 496 с.
45. Lavie, Y., Cao, H., Bursten, S. L., Giuliano, A. E., and Cabot, M. C. (1996) Accumulation of glucosylceramides in multidrug-resistant cancer cells, *J. Biol. Chem.*, **271**, 19530-19536, doi: 10.1074/jbc.271.32.19530.
46. Lucci, A., Cho, W. I., Han, T. Y., Giuliano, A. E., Morton, D. L., and Cabot, M. C. (1998) Glucosylceramide: a marker for multiple-drug resistant cancers, *Anticancer Res.*, **18**, 475-480.
47. Russo, D., Parashuraman, S., and D'Angelo, G. (2016) Glycosphingolipid-protein interaction in signal transduction, *Int. J. Mol. Sci.*, **17**, 1732, doi: 10.3390/ijms17101732.
48. Sasaki, N., Toyoda, M., and Ishiwata, T. (2021) Gangliosides as signaling regulators in cancer, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 5076, doi: 10.3390/ijms22105076.
49. De Maria, R., Lenti, L., Malisan, F., d'Agostino, F., Tomassini, B., Zeuner, A., Rippo, M. R., and Testi, R. (1997) Requirement for GD3 ganglioside in CD95- and ceramide-induced apoptosis, *Science*, **277**, 1652-1655, doi: 10.1126/science.277.5332.1652.
50. Veldman, R. J., Klappe, K., Hinrichs, J., Hummel, I., van der Schaaf, G., Sietsma, H., and Kok, J. W. (2002) Altered Sphingolipid metabolism in multidrug-resistant ovarian cancer cells is due to uncoupling of glycolipid biosynthesis in the Golgi apparatus, *FASEB J.*, **16**, 1111-1113, doi: 10.1096/fj.01-0863fje.
51. Xiao, S., Finkielstein, C. V., and Capelluto, D. G. (2013) The enigmatic role of sulfatides: new insights into cellular functions and mechanisms of protein recognition, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **991**, 27-40, doi: 10.1007/978-94-007-6331-9_3.
52. Suchański, J., and Ugorski, M. (2016) The biological role of sulfatides, *Postępy Hig. Med. Dosw. (Online)*, **70**, 489-504, doi: 10.5604/17322693.1201720.
53. Su, L., Athamna, M., Wang, Y., Wang, J., Freudenberg, M., Yue, T., Wang, J., Moresco, E. M. Y., He, H., Zor, T., and Beutler, B. (2021) Sulfatides are endogenous ligands for the TLR4-MD-2 complex, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **118**, e2105316118, doi: 10.1073/pnas.2105316118.
54. Takahashi, T., and Suzuki, T. (2012) Role of sulfatide in normal and pathological cells and tissues, *J. Lipid Res.*, **53**, 1437-1450, doi: 10.1194/jlr.R026682.
55. Boath, A., Graf, C., Lidome, E., Ullrich, T., Nussbaumer, P., and Bornancin, F. (2008) Regulation and traffic of ceramide 1-phosphate produced by ceramide kinase: comparative analysis to glucosylceramide and sphingomyelin, *J. Biol. Chem.*, **283**, 8517-8526, doi: 10.1074/jbc.M707107200.
56. Yamaji, T., and Hanada, K. (2014) Sphingolipid metabolism and interorganellar transport: localization of Sphingolipid enzymes and lipid transfer proteins, *Traffic*, **16**, 101-122, doi: 10.1111/tra.12239.
57. Baumruker, T., Bornancin, F., and Billich, A. (2005) The role of sphingosine and ceramide kinases in inflammatory responses, *Immunol. Lett.*, **96**, 175-185, doi: 10.1016/j.imlet.2004.09.001.
58. Bhadwal, P., Dahiya, D., Shinde, D., Vaiphei, K., Math, R. G. H., Randhawa, V., and Agnihotri, N. (2020) LC-HRMS based approach to identify novel sphingolipid biomarkers in breast cancer patients, *Sci. Rep.*, **10**, 4668, doi: 10.1038/s41598-020-61283-w.
59. Rivera, I. G., Ordoñez, M., Presa, N., Gangoiti, P., Gomez-Larrauri, A., Trueba, M., Fox, T., Kester, M., and Gomez-Muñoz, A. (2016) Ceramide 1-phosphate regulates cell migration and invasion of human pancreatic cancer cells, *Biochem. Pharmacol.*, **102**, 107-119, doi: 10.1016/j.bcp.2015.12.009.
60. Payne, A. W., Pant, D. K., Pan, T.-C., and Chodosh, L. A. (2014) Ceramide kinase promotes tumor cell survival and mammary tumor recurrence, *Cancer Res.*, **74**, 6352-6363, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-1292.
61. Canals, D., Perry, D. M., Jenkins, R. W., and Hannun, Y. A. (2011) Drug targeting of Sphingolipid metabolism: sphingomyelinases and ceramidases, *Br. J. Pharmacol.*, **163**, 694-712, doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01279.x.
62. Dyatlovitskaya, E. V., and Kandyba, A. G. (2006) Role of biologically active sphingolipids in tumor growth, *Biochemistry (Moscow)*, **71**, 10-17, doi: 10.1134/s0006297906010020.
63. Pulkoski-Gross, M. J., Donaldson, J. C., and Obeid, L. M. (2015) Sphingosine-1-phosphate metabolism: a structural perspective, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **50**, 298-313, doi: 10.3109/10409238.2015.1039115.
64. Takabe, K., and Spiegel, S. (2014) Export of sphingosine-1-phosphate and cancer progression, *J. Lipid Res.*, **55**, 1839-1846, doi: 10.1194/jlr.R046656.
65. Hla, T., and Dannenberg, A. J. (2012) Sphingolipid signaling in metabolic disorders, *Cell Metab.*, **16**, 420-434, doi: 10.1016/j.cmet.2012.06.017.
66. Pyne, N. J., Tonelli, F., Lim, K. G., Long, J. S., Edwards, J., and Pyne, S. (2012) Sphingosine 1-phosphate signalling in cancer, *Biochem. Soc. Transact.*, **40**, 94-100, doi: 10.1042/bst20110602.
67. Sanchez, T., Skoura, A., Wu, M. T., Casserly, B., Harrington, E. O., and Hla, T. (2007) Induction of vascular permeability by the sphingosine-1-phosphate receptor-2 (S1p2r) and its downstream effectors ROCK and PTEN, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **27**, 1312-1318, doi: 10.1161/ATVBAHA.107.143735.
68. Cuvillier, O., and Levade, T. (2001) Sphingosine 1-phosphate antagonizes apoptosis of human leukemia cells by inhibiting release of cytochrome c and Smac/Diablo from mitochondria, *Blood J. Am. Soc. Hematol.*, **98**, 2828-2836, doi: 10.1182/blood.v98.9.2828.
69. Ponnusamy, S., Selvam, S. P., Mehrotra, S., Kawamori, T., Snider, A. J., Obeid, L. M., Shao, Y.,

- Sabbadini, R., and Ogretmen, B. (2012) Communication between host organism and cancer cells is transduced by systemic sphingosine kinase 1/sphingosine 1-phosphate signalling to regulate tumour metastasis, *EMBO Mol. Med.*, **4**, 761-775, doi: 10.1002/emmm.201200244.
70. Park, K. S., Kim, M. K., Lee, H. Y., Kim, S. D., Lee, S. Y., Kim, J. M., Ryu, S. H., and Bae, Y. S. (2007) S1p stimulates chemotactic migration and invasion in Ovar3 ovarian cancer cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **356**, 239-244, doi: 10.1016/j.bbrc.2007.02.112.
 71. Dyatlovitskaya, E. V., and Kandyba, A. G. (2006) Sphingolipids in tumor metastases and angiogenesis, *Biochemistry (Moscow)*, **71**, 347-353, doi: 10.1134/s0006297906040018.
 72. Pitson, S. M. (2011) Regulation of sphingosine kinase and sphingolipid signaling, *Trends Biochem Sci.*, **36**, 97-107, doi: 10.1016/j.tibs.2010.08.001.
 73. Dominguez, G., Maddelein, M. L., Pucelle, M., Nicaise, Y., Maurage, C. A., Duyckaerts, C., Cuvillier, O., and Delisle, M. B. (2018) Neuronal sphingosine kinase 2 subcellular localization is altered in Alzheimer's disease brain, *Acta Neuropathol. Commun.*, **6**, 25, doi: 10.1186/s40478-018-0527-z.
 74. Chen, H., Haddadi, N., Zhu, X., Hatoum, D., Chen, S., Nassif, N. T., Lin, Y., and McGowan, E. M. (2022) Expression profile of sphingosine kinase 1 isoforms in human cancer tissues and cells: importance and clinical relevance of the neglected 1b-isoform, *J. Oncol.*, **7**, 2250407, doi: 10.1155/2022/2250407.
 75. Haddadi, N., Lin, Y., Simpson, A. M., Nassif, N. T. and McGowan, E. M. (2017) "Dicing and Splicing" sphingosine kinase and relevance to cancer, *Int. J. Mol. Sci.*, **18**, 1891, doi: 10.3390/ijms18091891.
 76. Diaz Escarcega, R., McCullough, L. D. and Tsvetkov, A. S. (2021) The functional role of sphingosine kinase 2, *Front. Mol. Biosci.*, **8**, 683767, doi: 10.3389/fmolb.2021.683767.
 77. Pyne, N. J. and Pyne, S. (2010) Sphingosine 1 phosphate and cancer, *Nat. Rev. Cancer*, **10**, 489-503, doi: 10.1038/nrc2875.
 78. Kawamori, T., Kaneshiro, T., Okumura, M., Maalouf, S., Uflacker, A., Bielawski, J., Hannun, Y. A., and Obeid, L. M. (2009) Role for Sphingosine kinase 1 in colon carcinogenesis, *FASEB J.*, **23**, 405-414, doi: 10.1096/fj.08-117572.
 79. Peng, J., Chen, B., Shen, Z., Deng, H., Liu, D., Xie, X., Gan, X., Xu, X., Huang, Z., and Chen, J. (2015) DNA promoter hypermethylation 538 contributes to down-regulation of galactocerebrosidase gene 539 in lung and head and neck cancers, *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, **8**, 11042-11050.
 80. Zhao, Y., Guo, Y., Wang, Z., Xiao, Z., Li, R., Luo, A., Wu, C., Jing, Z., Sun, N., Chen, X., Du, H., and Zeng, Y. (2015) GALC gene is downregulated by promoter hypermethylation in Epstein-Barr virus-associated nasopharyngeal carcinoma *Oncol. Rep.*, **34**, 1369-1378, doi: 10.3892/or.2015.4134.
 81. Görögh, T., Rudert, H., Lippert, B. M., Gottschlich, S., Maune, S., Heidorn, K., Maass, J., Hoffmann, M., Meyer, J. E., Rathcke, I. O., Folz, B. J., Hortobagyi, T., and Werner, J. A. (1999) Transcriptional repression of the human galactocerebrosidase gene in squamous cell carcinomas of the larynx, *Int. J. Cancer*, **83**, 750-754, doi: 10.1002/(sici)1097-0215(19991210)83:6<750::aid-ijc9>3.0.co;2-v.
 82. Sui, G., Affar, eB., Shi, Y., Brignone, C., Wall, N. R., Yin, P., Donohoe, M., Luke, M. P., Calvo, D., Grossman, S. R., and Shi, Y. (2004) Yin Yang 1 (YY1) is a negative regulator of p53, *Cell*, **117**, 859-872, doi: 10.1016/j.cell.2004.06.004.
 83. Yakovleva, T., Kolesnikova, L., Vukojević, V., Gileva, I., Tan-No, K., Austen, M., Lüscher, B., Ekström, T. J., Terenius, L., and Bakalkin, G. (2004) YY1 binding to a subset of p53 DNA-target sites regulates p53-dependent transcription, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **318**, 615-624, doi: 10.1016/j.bbrc.2004.04.065.
 84. Presta, M. (2021) β -Galactosylceramidase in cancer: friend or foe? *Trends Cancer*, **7**, 974-977, doi: 10.1016/j.trecan.2021.08.001.
 85. Belleri, M., Paganini, G., Coltrini, D., Ronca, R., Zizioli, D., Corsini, M., Barbieri, A., Grillo, E., Calza, S., Bresciani, R., Maiorano, E., Mastropasqua, M. G., Annese, T., Giacomini, A., Ribatti, D., Casas, J., Levade, T., Fabrias, G., and Presta, M. (2020) β -Galactosylceramidase promotes melanoma growth via modulation of ceramide metabolism, *Cancer Res.*, **80**, 5011-5023, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-19-3382.
 86. Barth, B. M., Shanmugavelandy, S. S., Tancelosky, D. M., Kester, M., Morad, S. A., and Cabot, M. C. (2013) Gaucher's disease and cancer: a sphingolipid perspective, *Crit. Rev. Oncog.*, **18**, 221-234, doi: 10.1615/critrevoncog.2013005814.
 87. Henry, B., Ziobro, R., Becker, K. A., Kolesnick, R., and Gulbins, E. (2013) Acid sphingomyelinase, *Handb. Exp. Pharmacol.*, **215**, 77-88, doi: 10.1007/978-3-7091-1368-4_4.
 88. Hertervig, E., Nilsson, A., Nyberg, L., and Duan, R. D. (1997) Alkaline sphingomyelinase activity is decreased in human colorectal carcinoma, *Cancer*, **79**, 448-453, doi: 10.1002/(sici)1097-0142(19970201)79:3<448::aid-cnrc4>3.0.co;2-e.
 89. Demircan, B., Dyer, L. M., Gerace, M., Lobenhofer, E. K., Robertson, K. D., and Brown, K. D. (2009) Comparative epigenomics of human and mouse mammary tumors, *Genes Chromosomes Cancer*, **48**, 83-97, doi: 10.1002/gcc.20620.
 90. Clarke, C. J. (2018) Neutral sphingomyelinases in cancer, *Sphingolipids Cancer*, **140**, 97-119, doi: 10.1016/bs.acr.2018.04.010.

91. Revill, K., Wang, T., Lachenmayer, A., Kojima, K., Harrington, A., Li, J., Hoshida, Y., Llovet, J. M., and Powers, S. (2013) Powers genome-wide methylation analysis and epigenetic unmasking identify tumor suppressor genes in hepatocellular carcinoma, *Gastroenterology*, **145**, 1424-1435, doi: 10.1053/j.gastro.2013.08.055.
92. Kim, W. J., Okimoto, R. A., Purton, L. E., Goodwin, M., Haserlat, S. M., Dayyani, F., Sweetser, D. A., McClatchey, A. I., Bernard, O. A., Look, A. T., Bell, D. W., Scadden, D. T., and Haber, D. A. (2008) Mutations in the neutral sphingomyelinase gene SMPD3 implicate the ceramide pathway in human leukemias, *Blood*, **111**, 4716-4722, doi: 10.1182/blood-2007-10-113068.
93. Marchesini, N., and Hannun, Y. A. (2004) Acid and neutral sphingomyelinases: roles and mechanisms of regulation, *Biochem. Cell Biol.*, **82**, 27-44, doi: 10.1139/o03-091.
94. Megha, and London, E. (2004) Ceramide selectively displaces cholesterol from ordered lipid domains (rafts): implications for lipid raft structure and function, *J. Biol. Chem.*, **279**, 9997-10004, doi: 10.1074/jbc.M309992200.
95. Hannun, Y. A., and Obeid, L. M. (2018) Sphingolipids and their metabolism in physiology and disease, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **19**, 175-191, doi: 10.1038/nrm.2017.107.
96. Jarvis, W. D., Kolesnick, R. N., Fornari, F. A., Traylor, R. S., Gewirtz, D. A., and Grant, S. (1994) Induction of apoptotic DNA damage and cell death by activation of the Sphingomyelin pathway, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 73-77, doi: 10.1073/pnas.91.1.73.
97. Aslan, M., Afsar, E., Kirimlioglu, E., Ceker, T., and Yilmaz, C. (2021) Antiproliferative effects of thymoquinone in MCF-7 breast and HepG2 liver cancer cells: possible role of ceramide and ER stress, *Nutr. Cancer*, **73**, 460-472, doi: 10.1080/01635581.2020.1751216.
98. Kilkus, J., Goswami, R., Testai, F. D., and Dawson, G. (2003) Ceramide in rafts (detergent-insoluble fraction) mediates cell death in neurotumor cell lines, *J. Neurosci. Res.*, **72**, 65-75, doi: 10.1002/jnr.10549.
99. Rotolo, J. A., Zhang, J., Donepudi, M., Lee, H., Fuks, Z., and Kolesnick, R. (2005) Caspase-dependent and -independent activation of acid sphingomyelinase signaling, *J. Biol. Chem.*, **280**, 26425-26434, doi: 10.1074/jbc.M414569200.
100. Ferranti, C. S., Cheng, J., Thompson, C., Zhang, J., Rotolo, J. A., Buddaseth, S., Fuks, Z., and Kolesnick, R. N. (2020) Fusion of lysosomes to plasma membrane initiates radiation-induced apoptosis, *J. Cell Biol.*, **219**, e201903176, doi: 10.1083/jcb.201903176.
101. Clarke, C. J., Shamseddine, A. A., Jacob, J. J., Khalife, G., Burns, T. A., and Hannun, Y. A. (2016) ATRA transcriptionally induces nSMase2 through CBP/p300-mediated histone acetylation, *J. Lipid Res.*, **57**, 868-881, doi: 10.1194/jlr.m067447.
102. Morad, S. A. and Cabot, M. C. (2013) Ceramide-orchestrated signalling in cancer cells, *Nat. Rev. Cancer*, **13**, 51-65, doi: 10.1038/nrc3398.
103. Tan, S. F., Liu, X., Fox, T. E., Barth, B. M., Sharma, A., Turner, S. D., Awwad, A., Dewey, A., Doi, K., Spitzer, B., Shah, M. V., Morad, S. A., Desai, D., Amin, S., Zhu, J., Liao, J., Yun, J., Kester, M., Claxton, D. F., Wang, H. G., and Loughran, T. P., Jr (2016) Acid ceramidase is upregulated in AML and represents a novel therapeutic target, *Oncotarget*, **7**, 83208-83222, doi: 10.18632/oncotarget.13079.
104. Xu, R., Jin, J., Hu, W., Sun, W., Bielawski, J., Szulc, Z., Taha, T., Obeid, L. M., and Mao, C. (2006) Golgi alkaline ceramidase regulates cell proliferation and survival by controlling levels of sphingosine and S1P, *FASEB J.*, **20**, 1813-1825, doi: 10.1096/fj.05-5689com.
105. Coant, N., Sakamoto, W., Mao, C., and Hannun, Y. A. (2017) Ceramidases, roles in sphingolipid metabolism and in health and disease, *Adv. Biol. Regul.*, **63**, 122-131, doi: 10.1016/j.jbior.2016.10.002.
106. Maeda, I., Takano, T., Matsuzuka, F., Maruyama, T., Higashiyama, T., Liu, G., Kuma, K., and Amino, N. (1999) Rapid screening of specific changes in mRNA in thyroid carcinomas by sequence specific-differential display: decreased expression of acid ceramidase mRNA in malignant and benign thyroid tumors, *Int. J. Cancer*, **81**, 700-704, doi: 10.1002/(sici)1097-0215(19990531)81:5<700::aid-ijc5>3.0.co;2-d.
107. Roh, J. L., Park, J. Y., Kim, E. H., and Jang, H. J. (2016) Targeting acid ceramidase sensitises head and neck cancer to cisplatin, *Eur. J. Cancer*, **52**, 163-172, doi: 10.1016/j.ejca.2015.10.056.
108. Poterala-Hejmo, A., Golda, A., Pacholczyk, M., Student, S., Tylki-Szymańska, A., and Lalik, A. (2020) A possible role for arylsulfatase G in dermatan sulfate metabolism, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 4913, doi: 10.3390/ijms21144913.
109. Kolter, T., and Sandhoff, K. (2005) Principles of lysosomal membrane digestion: stimulation of Sphingolipid degradation by sphingolipid activator proteins and anionic lysosomal lipids, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **21**, 81-103, doi: 10.1146/annurev.cellbio.21.122303.120013.
110. Garcia, J., Callewaert, N., and Borsig, L. (2007) P-selectin mediates metastatic progression through binding to sulfatides on tumor cells, *Glycobiology*, **17**, 185-196, doi: 10.1093/glycob/cwl059.
111. Simonis, D., Schlesinger, M., Seelandt, C., Borsig, L., and Bendas, G. (2010) Analysis of SM4 sulfatide as a P-selectin ligand using model membranes, *Biophys. Chem.*, **150**, 98-104, doi: 10.1016/j.bpc.2010.01.007.
112. Waggoner, D. W., Gómez-Muñoz, A., Dewald, J., and Brindley, D. N. (1996) Phosphatidate phospho-

- hydrolase catalyzes the hydrolysis of ceramide 1-phosphate, lysophosphatidate, and sphingosine 1-phosphate, *J. Biol. Chem.*, **271**, 16506-16509, doi: 10.1074/jbc.271.28.16506.
113. Boudker, O., and Futerman, A. H. (1993) Detection and characterization of ceramide-1-phosphate phosphatase activity in rat liver plasma membrane, *J. Biol. Chem.*, **268**, 22150-22155.
 114. Long, J., Darroch, P., Wan, K. F., Kong, K. C., Ktistakis, N., Pyne, N. J., and Pyne, S. (2005) Regulation of cell survival by lipid phosphate phosphatases involves the modulation of intracellular phosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate pools, *Biochem. J.*, **391**, 25-32, doi: 10.1042/BJ20050342.
 115. Zhao, Y., Usatyuk, P. V., and Cummings, R. (2005) Lipid phosphate phosphatase-1 regulates lysophosphatidic acid-induced calcium release, NF-kappaB activation and interleukin-8 secretion in human bronchial epithelial cells, *Biochem. J.*, **385**, 493-502, doi: 10.1042/BJ20041160.
 116. Kihara, A., Mitsutake, S., Mizutani, Y., and Igarashi, Y. (2007) Metabolism and biological functions of two phosphorylated sphingolipids, sphingosine 1-phosphate and ceramide 1-phosphate, *Prog. Lipid Res.*, **46**, 126-144, doi: 10.1016/j.plipres.2007.03.001.
 117. Uranbileg, B., Kurano, M., Kano, K., Sakai, E., Arita, J., Hasegawa, K., Nishikawa, T., Ishihara, S., Yamashita, H., Seto, Y., Ikeda, H., Aoki, J., and Yatomi, Y. (2022) Sphingosine 1-phosphate lyase facilitates cancer progression through converting sphingolipids to glycerophospholipids, *Clin. Transl. Med.*, **12**, e1056, doi: 10.1002/ctm2.1056.
 118. Hibbs, K., Skubitz, K. M., Pambuccian, S. E., Casey, R. C., Burleson, K. M., Oegema, T. R., Jr, Thiele, J. J., Grindle, S. M., Bliss, R. L., and Skubitz, A. P. (2004) Differential gene expression in ovarian carcinoma: identification of potential biomarkers, *Am. J. Pathol.*, **165**, 397-414, doi: 10.1016/S0002-9440(10)63306-8.
 119. Uranbileg, B., Ikeda, H., Kurano, M., Enooku, K., Sato, M., Saigusa, D., Aoki, J., Ishizawa, T., Hasegawa, K., Kokudo, N., and Yatomi, Y. (2016) Increased mRNA levels of sphingosine kinases and S1P lyase and reduced levels of S1P were observed in hepatocellular carcinoma in association with poorer differentiation and earlier recurrence, *PloS One*, **11**, e0149462, doi: 10.1371/journal.pone.0149462.
 120. Uranbileg, B., Nishikawa, T., Ikeda, H., Kurano, M., Sato, M., Saigusa, D., Aoki, J., Watanabe, T., and Yatomi, Y. (2018) Evidence suggests sphingosine 1-phosphate might be actively generated, degraded, and transported to extracellular spaces with increased S1P2 and S1P3 expression in colon cancer, *Clin. Colorectal Cancer*, **17**, e171-e182, doi: 10.1016/j.clcc.2017.11.004.
 121. Oskouian, B., Sooriyakumaran, P., Borowsky, A. D., Crans, A., Dillard-Telm, L., Tam, Y. Y., Bandhuvula, P., and Saba, J. D. (2006) Sphingosine-1-phosphate lyase potentiates apoptosis via p53- and p38-dependent pathways and is down-regulated in colon cancer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 17384-17389, doi: 10.1073/pnas.0600050103.

METABOLISM OF SPHINGOLIPIDS IN TUMOR CELLS

Review

V. S. Pokrovsky*, V. I. Ivanova-Radkevich, and O. M. Kuznetsova

*Peoples Friendship University of Russia (RUDN University),
117198 Moscow, Russia; e-mail: pokrovskiy-vs@rudn.ru*

Sphingolipids are a diverse family of complex lipids, in which the determining component is sphingoid base, usually bound to a fatty acid by an amide bond. The metabolism of sphingolipids has long remained on the periphery of biochemical research. Recently, it has begun to attract more and more attention due to the diverse and often multidirectional effects of sphingolipids with a similar chemical structure. Sphingosine and ceramides (N-acylsphingosines), as well as their phosphorylated derivatives (sphingosine-1-phosphate and ceramide-1-phosphates) play the role of signaling molecules. Ceramides can cause apoptosis, regulate the stability of cell membranes and the cellular response to stress. In general, ceramides and sphingoid bases as signaling molecules slow down anabolic and accelerate catabolic reactions, suppressing cell proliferation. Phosphorylated derivatives of ceramide-1-phosphate and sphingosine-1-phosphate, on the contrary, stimulate cell proliferation and division. The significant participation of sphingolipids in the regulation of apoptosis and cell division processes makes them critically important compounds regulating tumor progression. The enzymes of sphingolipid metabolism and the receptors of the corresponding sphingolipids can be considered as targets for antitumor therapy. This review aims to highlight the main pathways of metabolism of sphingolipids in human cells, with special emphasis on the known features of their metabolism in tumor cells.

Keywords: sphingolipids, tumor, ceramide, dihydroceramide, sphingomyelin, sphingosine-1-phosphate, proliferation, cancer

МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ОРКЕСТР МИКРОБИОТИЧЕСКИХ МЕТАБОЛИТОВ В СЦЕНАРИИ КАНЦЕРОГЕНЕЗА

Обзор

© 2023 О.П. Шатова^{1,2*}, А.А. Заболотнева¹, А.В. Шестопапов^{1,3}

¹ Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова,
биологический факультет, кафедра биохимии,
117997 Москва, Россия; электронная почта: shatova.op@gmail.com

² Российский Университет Дружбы Народов, 117198 Москва, Россия

³ Национальный медицинский исследовательский центр
Детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева, 117997 Москва, Россия

Поступила в редакцию 25.01.2023

После доработки 09.03.2023

Принята к публикации 09.03.2023

Механизмы канцерогенеза имеют необычайно сложный характер. Множество игроков обуславливают сценарий злокачественной трансформации клеток, опухолевый рост и метастазирование. В последние десятилетия все больше внимания уделяется роли симбиотической человеку микробиоты в регуляции метаболизма и функционирования иммунной системы организма хозяина. Такой симбиоз макроорганизма и его микроорганизмов объединили в понятие холоорганизма. В процессе коэволюции участников холоорганизма формировались пути их взаимодействия, а метаболиты микробиоты приобрели особую роль — сигнальных молекул и основных регуляторов молекулярных взаимодействий в холоорганизме. Вовлекаясь в сигнальные пути хозяина, бактериальные метаболиты оказались обязательными участниками как физиологических, так и патологических процессов, включая опухолевый рост. При этом эффекты сигнальных метаболитов зачастую имеют разнонаправленный характер, проявляющийся в воздействии как на функции клеток хозяина, так и на метаболическую активность и состав микробиома. В настоящем обзоре рассматривается роль некоторых микробиотических метаболитов в индукции и профилактике процесса злокачественной трансформации клеток в организме хозяина, а также их влияние на эффективность противоопухолевой терапии. Мы постарались обратить внимание читателя на роль некоторых компонентов молекулярного оркестра микробных метаболитов в инициации и прогрессии опухолевого роста.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: микробиота, канцерогенез, сигнальные метаболиты, рак.

DOI: 10.31857/S0320972523070023, **EDN:** FUVBHO

ВВЕДЕНИЕ

Молекулярные механизмы канцерогенеза и патогенеза злокачественных новообразований имеют сложный и вместе с тем индивидуальный характер [1]. Множество факторов, включая генетические и эпигенетические особенности, возраст, образ жизни, особенности диеты,

наличие вредных привычек, воздействие условий среды (действие ультрафиолетового или ионизирующего излучения, химических субстанций и др.), определяют инициацию злокачественной трансформации клеток и способствуют прогрессивному росту опухоли [1]. Нарастающее количество публикаций подчеркивает ключевую роль молекулярно-генети-

Принятые сокращения: АФК — активные формы кислорода; ВЖК — вторичные желчные кислоты; ДК — дендритные клетки; ДХК — дезоксихолевая кислота; КЖК — короткоцепочечные жирные кислоты; ЛПС — липополисахарид; ЛХК — литохолевая кислота; ОСК — опухолевые стволовые клетки; AhR — арилгидрокарбонные рецепторы; CAR — конститутивный андростановый рецептор; FXR — ядерный фарнезоидный X-рецептор; GPR41 и GPR43 — рецепторы, ассоциированные с G-белком; IDO1 — индоламинпиррол-2,3-диоксигеназа 1 (Indoleamine-pyrrrole 2,3-dioxygenase); NKT-клетки — естественные клетки-киллеры; TGR5 (GPBAR1) — ассоциированный с G-белком рецептор желчных кислот 1; TLR — толл-подобный рецептор (toll-like receptor); Treg — регуляторные Т-клетки.

* Адресат для корреспонденции.

ческих исследований при подборе таргетной терапии [2]. В последние годы появляется все больше доказательств способности микробиоты оказывать влияние на злокачественную трансформацию клеток на метаболическом и молекулярно-генетическом уровнях. Все больше исследований посвящается изучению влияния симбиотической микробиоты на метаболизм хозяина. Развиваясь в процессе эволюции параллельно организму хозяина, микробиота во многом формировала фенотипы наших предков [3]. Сопряжение метаболизма макроорганизма и микробиоты, а также унификация сигнальных молекул, используемых для коммуникации и регуляции совместного метаболизма холоорганизма, привели к значимой вовлеченности микроорганизмов, а точнее — их метаболитов, в патогенез многих заболеваний человека. В первую очередь, к таким заболеваниям относятся метаболические расстройства — ожирение, неалкогольная жировая инфильтрация печени, дислипидемии, инсулинорезистентность и сахарный диабет 2-го типа [4]. Однако развитие ряда онкозаболеваний также ассоциировано с воздействием микроорганизмов [5]. Несмотря на то что Международное агентство по исследованию рака (IACR) в настоящее время выделяет только 11 инфекционных агентов (вирусы Эпштейн-Барра, гепатита В и С, саркомы Капоши (герпес-вирус 8-го типа), иммунодефицита человека (ВИЧ), папилломавирус типа 16, человеческий Т-клеточный лимфотропный вирус типа 1 (HTLV-1), *Helicobacter pylori*, *Clonorchis sinensis*, *Opisthorchis viverrini* и *Schistosoma haematobium*), относящихся к первой группе канцерогенных возбудителей (то есть микробов, запускающих процесс злокачественной трансформации в клетках организма-хозяина) [6], участие других микроорганизмов, входящих в экосистему комменсальной микробиоты, является не менее значимым в процессе канцерогенеза. Способы, с помощью которых микробиота влияет на процесс злокачественной трансформации клеток, будь то повышение или снижение риска развития заболеваний для хозяина, можно разделить на три основные группы: (1) изменение баланса между пролиферацией и гибелью клеток хозяина, (2) модуляция функций иммунной системы и (3) влияние на образование метаболитов, синтезируемых организмом хозяина, поступающих с пищей и образуемых самой микробиотой [6].

В настоящем обзоре мы задались целью кратко рассмотреть роль комменсальной микробиоты, а именно ее метаболитов, в индук-

ции и профилактике процесса канцерогенеза в организме хозяина, а также их влияние на эффективность противоопухолевой терапии.

МИКРОБИОТИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ КАК МУТАГЕНЫ И РЕГУЛЯТОРЫ ПРОЛИФЕРАЦИИ КЛЕТОК ОРГАНИЗМА-ХОЗЯИНА

В процессе эволюции у многих микроорганизмов возникли механизмы повреждения ДНК, позволяющие уничтожать конкурентов и, таким образом, выживать в микробном мире. Однако в клетках хозяина эти микробные защитные факторы могут выступать в роли мутагенов, тем самым способствуя канцерогенезу. Примерами могут служить колибактин, экспрессируемый *Escherichia coli* группы B2, а также другими энтеробактериями [6], токсин *Bacteroides fragilis* (Bft), продуцируемый энтеротоксигенными *B. fragilis*, и цитолетальный токсин растяжения (CDT), продуцируемый многими грамотрицательными бактериями, такими как *E. coli*, *Shigella dysenteriae* и *H. pylori* [7]. Известно, что и колибактин, и CDT могут вызывать повреждения двухцепочечной ДНК, хромосомную нестабильность и промотировать процесс сенесценции в эукариотических клетках [8, 9]. Токсин Bft, напротив, действует косвенно стимулируя образование активных форм кислорода (АФК), которые, образуясь в высоких концентрациях, повреждают ДНК хозяина, опережая действие механизмов ее репарации [7].

Некоторые белки, экспрессируемые комменсальными микроорганизмами, могут активировать сигнальные пути, регулирующие пролиферацию, выживание, миграцию эукариотических клеток. Примером такого фактора является белок CagA, кодируемый цитотоксин-ассоциированным геном А (*CagA*, cytotoxin associated gene) и экспрессируемый онкогенными штаммами *H. pylori* типа 1; по сути, он является фактором вирулентности *H. pylori* [10]. Проникая в цитоплазму клеток хозяина, CagA аберрантно активирует β -катенин, тем самым запуская сигнальный путь Wnt и приводя к активации транскрипции генов, участвующих в поддержании стволовых свойств клеток, пролиферации, миграции, иными словами — процессах, необходимых для поддержания злокачественного роста. Схожим образом представитель микробиоты полости рта *Fusobacterium nucleatum*, связанный с развитием колоректальной аденомы и аденокарциномы человека, экспрессирует белок FadA

(Adhesin A), который является фактором адгезии на поверхности бактериальных клеток, но одновременно с этим может связывать Е-кадгерин хозяина, что приводит к активации β-катенина [11]. Штаммы *Salmonella typhi* секретируют белок AvrA — эффекторный белок, обуславливающий взаимодействие бактериального патогена с организмом хозяина, который также может активировать передачу сигналов через β-катенин и связан с развитием гепатобилиарного рака [12].

Феномен активации сигнального пути Wnt/β-катенина отражает процесс конвергентной эволюции микробиоты и клеток хозяина и, вероятно, связан с приспособительными реакциями микроорганизмов для создания новой ниши обитания. Но, с другой стороны, присутствие бактерий, потенцирующих рак, и их способность взаимодействовать с Е-кадгеринном в развивающихся опухолях указывает на то, что нарушение барьерной функции тканей хозяина является критическим шагом в развитии некоторых типов злокачественных опухолей. В подтверждение вышесказанному можно привести тот факт, что производство аммиака *H. pylori* разрушает плотные клеточные соединения, нарушает клеточную целостность и, соответственно, повреждает эпителий желудка. Недавно сообщалось, что уреазы способствует росту опухоли и ее метастатическому распространению, индуцируя ангиогенез, и играет ключевую роль в прогрессировании рака желудка [10]. Таким образом, до 20% случаев онкопатологий связаны с мутагенными воздействиями патогенных бактерий, и еще больше — с дисбалансом кишечной микробиоты (дисбиозом) [13].

ОНКОГЕННАЯ РОЛЬ МИКРОБНЫХ МЕТАБОЛИТОВ

Другим путем воздействия микробиоты на процесс злокачественной трансформации клеток организма-хозяина является модуляция работы иммунокомпетентных клеток. В процессе коэволюции системы «хозяин—микробиота» возникали не только взаимовыгодные отношения, но и формировались барьеры, не допускающие патологического воздействия симбионтов на макроорганизм. Опухолевая трансформация и воспалительные заболевания могут возникать тогда, когда барьеры разрушаются, а микробы и иммунная система оказываются в таких условиях и средах, в которых они не эволюционировали совместно. Как только барьеры нарушены, микробные

метаболиты могут особым образом влиять на иммунные реакции в развивающемся микроокружении опухоли, оказывая провоспалительное и/или иммуносупрессивное воздействие. С другой стороны, результатом длительного сосуществования симбиотических микро- и макроорганизмов является продукция бактериальными клетками протективных (противовоспалительных и противоопухолевых) молекул, позволяющих защитить организм хозяина от роста злокачественной опухоли, тем самым обеспечив совместное выживание всего холоорганизма.

Желчные кислоты. Вторичные желчные кислоты (ВтЖК) являются важными метаболитами, образующимися в результате кишечной микробной ферментации первичных желчных кислот. К основным ВтЖК относятся дезоксихолевая кислота (ДХК), литохолевая кислота (ЛХК) и урсодезоксихолевая кислота (УДХК). В кишечнике ВтЖК могут влиять на структуру микробиотических сообществ [14, 15]. Ряд исследований продемонстрировал, что ВтЖК выступают в роли важнейших регуляторных молекул, которые могут активировать множество сигнальных путей [16, 17]. Под действием ВтЖК может происходить индукция пролиферации опухолевых клеток и ингибирование их апоптоза, стимуляция инвазии и метастазирования, а также индукция трансформации злокачественных клеток в опухолевые стволовые клетки (ОСК) [16]. Более того, ВтЖК способствуют канцерогенезу, регулируя функцию иммунных клеток [17]. Примечательно, что пищевой рацион с высоким содержанием жиров повышает относительную численность сульфатредуцирующих бактерий (таких как *Desulfovibrio vulgaris*), которые образуют проканцерогенные ЛХК и ДХК [18].

ВтЖК реализуют свои эффекты через ядерный фарнезоидный X-рецептор (FXR), рецептор 1 желчных кислот, связанный с G-белком (GPBAR1, иначе TGR5), рецептор витамина D (VDR), прегнан X-рецептор (PXR) и конститутивный андростановый рецептор (CAR) [19, 20]. При этом первичные желчные кислоты в основном активируют FXR, а ВтЖК активируют TGR5 [21]. Активация TGR5 приводит к увеличению пролиферации клеток кишечника, способствует повреждению ДНК и индуцирует клеточную сенесценцию, приводя к формированию секреторного фенотипа, ассоциированного со старением (SASP) [21]. Более того, ВтЖК, воздействуя на TGR5, могут ингибировать функции естественных клеток-киллеров (NKT-клеток), В-клеток, дендритных клеток (ДК) и макрофагов.

Так, ДХК и ЛХК могут ингибировать активацию макрофагов селезенки и кишечника, которая индуцируется толл-подобным рецептором-4 (TLR4) [22]. Они также могут ингибировать секрецию интерлейкина-6 (IL-6), интерферона- γ (IFN- γ), фактора некроза опухоли- α (TNF- α) и индуцировать поляризацию противоопухолевых макрофагов M1 на проканцерогенные макрофаги M2 [23]. ДХК и ЛХК подавляют секрецию TNF- α и IL-12, тем самым ингибируя функцию ДК [19]. ВтЖК могут ингибировать функцию В-клеток, которые проявляют противоопухолевое действие за счет секреции антител, а также фагоцитоза и активации системы комплемента [24]. ДХК и ЛХК могут ингибировать секрецию IL-6 и подавлять созревание В-клеток, тем самым снижая уровни иммуноглобулинов (IgE и IgG) [22]. Известно, что NKT-клетки секретируют IFN- γ и TNF- α для стимуляции апоптоза опухолевых клеток [25]. Однако ДХК и ЛХК ингибируют секрецию IFN- γ и TNF- α , тем самым подавляя и функцию NKT-клеток [23]. Кроме того, ДХК и ЛХК могут стимулировать секрецию IL-10 NKT-клетками, что приводит к подавлению секреции TNF- α и активности Т-лимфоцитов [26]. ВтЖК могут усиливать функцию регуляторных Т-клеток (Treg), которые, как известно, способствуют формированию иммуносупрессивного микроокружения и прогрессированию опухоли. Foxp3 является одним из ключевых факторов транскрипции семейства белков FOX, контролирующих развитие и функцию Treg [27]. Производное ЛХК — изоаллоЛХК — может увеличивать экспрессию Foxp3 в наивных CD4⁺ Т-клетках за счет повышения продукции АФК в митохондриях [28]. Установлено, что ВтЖК могут связываться не только с TGR5, но и с FXR — ядерными рецепторами, экспрессируемыми главным образом в кишечнике, печени и иммунных клетках [22]. Макрофаги и ДК экспрессируют как TGR5, так и FXR, тогда как NKT-клетки экспрессируют только FXR. Активация этих рецепторов желчными кислотами заставляет макрофаги продуцировать больше IL-10 и меньше IL-6 и IFN- γ , ДК — продуцировать меньше TNF- α и IL-12, а естественные клетки-киллеры — продуцировать меньше остеопонтина [22].

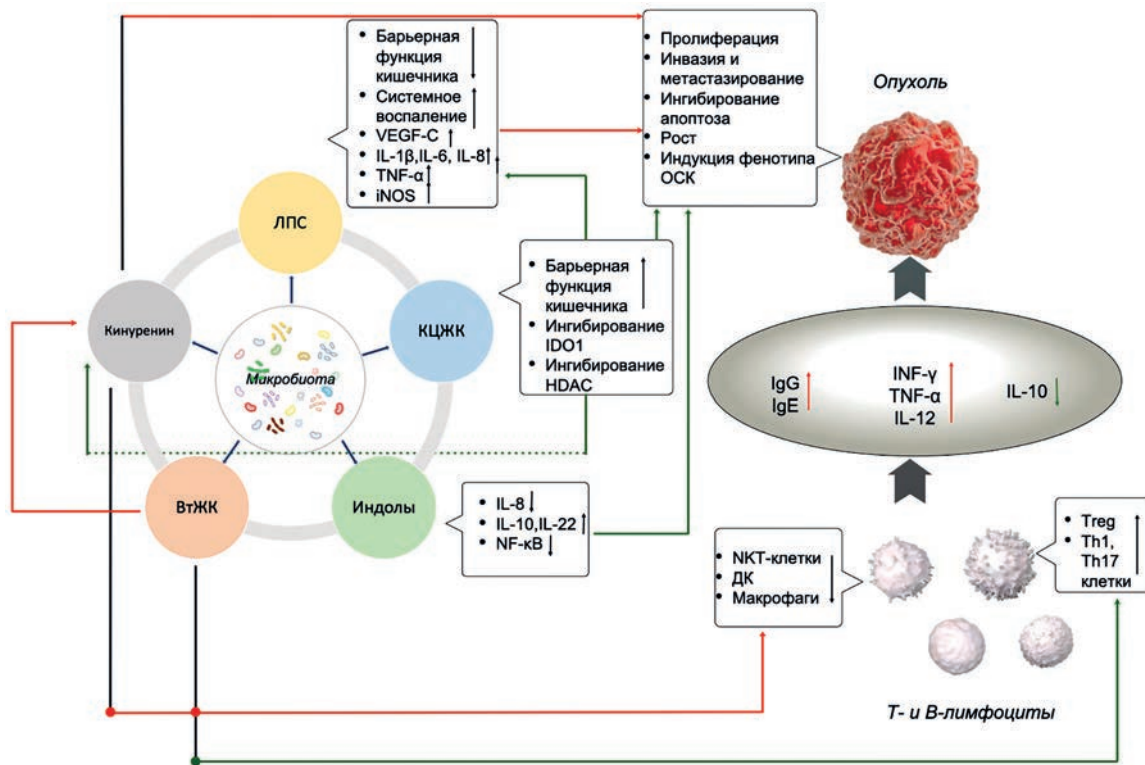
Таким образом, сигнальная функция ВтЖК связана с более высоким риском развития колоректального рака, а также некоторых внекишечных опухолей — рака печени, поджелудочной железы, пищевода, рака легкого и желудка [29–33].

Однако следует отметить, что в национальном когортном исследовании на Тайване были

показаны онкопротективные свойства синтетической УДХК в отношении развития колоректального рака [34].

Липополисахарид (ЛПС). ЛПС с его внутренним компонентом, липидом А, является наиболее эффективным защитным токсином клеточной стенки грамотрицательных бактерий и обуславливает провоспалительное действие на организм хозяина [35]. Просвет кишечника — среда обитания многих триллионов комменсальных бактерий — является основным резервуаром ЛПС в организме человека [36]. Интересно, что воздействие ЛПС на апикальные, но не базолатеральные, рецепторы эпителиальных клеток кишечника индуцирует их апоптоз посредством активации каспазы-3 и стимулирует разрушение плотных соединений ZO-1 (каркасный белок плотного соединения zonula occludens-1), тем самым повышая проницаемость эпителия. При транспортировке в плазме крови ЛПС связывается либо с ЛПС-связывающим белком (LBP), либо с липопротеинами плазмы и вызывает системное воспаление [37]. ЛПС участвует в онкогенном процессе посредством множества механизмов. ЛПС может стимулировать TNF- α , что впоследствии приводит к рекрутированию внутриклеточного ядерного фактора транскрипции- κ B (NF- κ B) с последующим высвобождением хемокинов и воспалительных цитокинов, включая IL-1 β , IL-6, IL-8 и TNF- α , а также повышению уровня экспрессии индуцируемой синтазы оксида азота (iNOS) и, соответственно, уровня прооксиданта — NO [38]. TNF- α отвечает за активацию различных сигнальных путей внутри клеток, ведущих к некрозу или апоптозу, поэтому играет ключевую роль в устойчивости к инфекциям и раку [39]. Активация TLR4-зависимого сигнального пути FAK/MyD88/IRAK4 контролирует вызванное ЛПС воспаление кишечника и проницаемость плотных соединений [39].

При этом было установлено, что повышение ЛПС в сыворотке крови увеличивает не только риск развития рака предстательной железы, но и повышает скорость метастазирования опухолевых клеток [40]. Так, при колоректальном раке были обнаружены статистически значимые отличия в концентрации ЛПС в ткани опухоли без метастазов и с метастазами в регионарные лимфатические узлы [36, 41]. ЛПС значительно увеличивает подвижность опухолевых клеток и способствует лимфангиогенезу. Кроме того, установлено, что ЛПС дозозависимо увеличивает экспрессию ангио- и лимфогенного фактора — фактора роста эндотелия сосудов C (VEGF-C).



Молекулярный оркестр микробиотических метаболитов в инициации и прогрессии опухолевого роста

Также было показано, что сигнальные пути TLR4/NF-κB/JNK были активированы ЛПС для непосредственного повышения экспрессии VEGF-C [41]. Выступая в качестве триггера воспалительных реакций, ЛПС был связан с патогенезом рака, включая развитие опухолей тучных клеток желудочно-кишечного тракта [42] (рисунок).

В ряде исследований было продемонстрировано, что различные микробные метаболиты — агонисты TLR4, действующие путем активации сигнальных путей, ассоциированных с TLR4, играют ключевую роль в регуляции выживания и прогрессирования роста опухолевых клеток при раке толстой кишки, поджелудочной железы, печени и молочной железы [43, 44]. Так, гиперэкспрессия TLR4 была установлена при колоректальном раке: это способствовало повышению пролиферации клеток, защите злокачественных клеток от апоптоза, повышению инвазии и метастазирования, а также созданию благоприятного для опухоли клеточного микроокружения. Более того, в последние годы все больше внимания уделяется изучению регуляции передачи сигналов через TLR4 в контексте онкогенеза, связанного с колитом [44].

Триптофан и его катаболиты. Метаболизм триптофана (Trp) через кинурениновый путь и микробное превращение Trp в индольные со-

единения имеет основополагающее значение для здоровья хозяина и особенно критичен при канцерогенезе толстой кишки [45]. Микробное сообщество является ключевой частью микроокружения опухоли и влияет на инициацию злокачественной трансформации, прогрессию опухолевого роста и ответ на лечение. Изменения в метаболизме Trp начинаются на ранней стадии опухолевого роста как адаптивный механизм, позволяющий злокачественным клеткам избегать иммунного надзора и метастазировать [46].

Одним из ключевых ферментов, ограничивающих скорость катаболизма Trp, является индоламин-2,3-диоксигеназа 1 (IDO1), который присутствует у *Firmicutes* [47]. Наиболее активно IDO1 экспрессируется у родов *Clostridium*, *Lachnospirillum*, *Ruminoclostridium* и *Roseburia* [47]. Активирующее влияние на экспрессию IDO1 оказывают провоспалительные цитокины — IFN-γ, TNF-α, простагландины, липополисахариды [48]. IDO1 превращает Trp в N-формилкинуренин с его последующей быстрой трансформацией в кинуренин, первый стабильный катаболит в данном пути. Затем из кинуренина образуются различные метаболиты, которые регулируют активность иммунных клеток [48].

Кинуренин регулирует иммунный гомеостаз в организме хозяина [49]. Эти эффекты

реализуются за счет уменьшения количества активированных Т-клеток, ДК и NKT-клеток, а также индукции апоптоза клеток Th1 для контроля чрезмерной воспалительной реакции [45]. Каждый нижестоящий метаболит кинуренина выполняет определенные функции. Кинуреновая кислота вызывает противовоспалительный ответ благодаря своим антиоксидантным свойствам, в то время как пикотиновая кислота проявляет противоопухолевую активность, подавляя активацию Т-клеток и с-Мус (протоонкогенный белок Мус, фактор транскрипции). При этом сам с-Мус ускоряет поглощение Тгр в раковых клетках толстой кишки путем усиления экспрессии транспортеров Тгр (SLC7A5 и SLC1A5) [45].

Кроме того, 3-гидроксиантралиновая и хинолиновая кислоты могут действовать как токсины, в том числе при раке толстой кишки [46]. Установлено, что при опухолевом росте повышаются активность IDO1, арилформамидазы и уровень кинуренина [50]. Важно отметить, что сывороточные концентрации кинуренина у онкобольных выше, по сравнению со здоровыми людьми. В то же время экспрессия и активность ферментов дальнейшего превращения кинуренина не изменяется при опухолевом росте, что позволяет предположить, что кинуренин является доминантным метаболитом обмена Тгр, повышенным при колоректальном раке [50].

Повышенные уровни кинуренина способствуют онкогенезу преимущественно двумя путями: 1) часть продуцируемого кинуренина может непосредственно индуцировать инактивацию Т-клеток и апоптоз, что приводит к уклонению от иммунного надзора; 2) оставшийся кинуренин может конститутивно активировать арилгидрокарбоновые рецепторы (AhR), что активирует транскрипцию генов, ответственных за ускользание опухоли от иммунного надзора, а также пролиферацию и метастазирование злокачественно трансформированных клеток. Таким образом, сигнальный путь кинуренин/AhR является одним из основных факторов, способствующих развитию рака толстой кишки [46, 50].

При этом следует указать, что повышение системного уровня кинуренина характерно для больных с опухолями различной локализации. Многие исследователи связывают этот факт со стимуляцией экспрессии IDO1 провоспалительными цитокинами, уровень которых повышается в организме при злокачественном опухолевом росте. Более того, у больных раком толстой кишки было обнаружено снижение содержания индола и повы-

шение микробиотической продукции кинуренина в кале [45]. Примечательно, что введение кинурениназы, фермента, который разрушает кинуренин, останавливает рост опухоли [51].

Недавно было показано, что добавки бутирата способствует снижению экспрессии IDO1 – таким образом, можно предположить, что комменсальные бактерии контролируют метаболизм Тгр и, соответственно, образование кинуренина через обмен короткоцепочечных жирных кислот (КЦЖК) [47].

Из индольных производных обмена Тгр наиболее представленными в кишечнике являются: индол-3-ацетамид, индол-3-ацетальдегид, индол-3-пируват, индол-3-альдегид, индол-3-ацетат, триптамин, индол-3-пропионовая кислота и индол-3-акриловая кислота. Индол и производные индола, помимо того, что являются критическими компонентами бактериального метаболизма, играют важную связующую и сигнальную роль между функциями хозяина и микробиоты. В микробных сообществах кишечника продукция индола влияет на образование спор, стабильность плазмид, образование биопленки, устойчивость к антибиотикам, деление клеток и вирулентность [52]. В организме хозяина индолы активируют сигнальные пути, которые приводят к изменениям барьерной функции кишечного эпителия, снижают проницаемость, способствуют иммунной толерантности, вытесняют патогены, уменьшают воспаление и контролируют выработку муцина [53]. Индольные соединения также могут действовать через AhR, обладая как про-, так и противовоспалительным действием [54]. Индолы могут снижать экспрессию провоспалительных факторов – IL-8 и NF-κB, и способствовать экспрессии противовоспалительных цитокинов, включая IL-10. Кроме того, индольные соединения регулируют гомеостаз кишечника посредством индукции секреции IL-22, что улучшает барьерную функцию, однако в контексте опухолевого роста (поздние стадии заболевания) продукция IL-22 может способствовать прогрессивному развитию новообразования [55] (рисунок). Большинство индолов и их производных оказывают защитные эффекты против воспалительных заболеваний кишечника, которые зачастую предшествуют развитию рака [52].

При изучении противоопухолевого влияния *Lactobacillus gallinarum* было установлено, что данные микроорганизмы гиперпродуцируют Тгр и индол-3-лактат и, таким образом, подавляют рост клеток колоректального рака [56]. Также на клеточных культурах было

показано, что обработка опухолевых клеток индол-3-лактатом увеличивала их апоптоз, а применение агонистов AhR уменьшало противоопухолевое действие индол-3-лактата.

Было установлено, что избыточное употребление пищевого холестерина снижает количество нормальных представителей микробиоты кишечника — *Bacteroides* и *Bifidobacterium*, что сопровождается снижением индол-3-пропионата и развитием жировой инфильтрации печени и в конечном счете — развитием гепатоцеллюлярной карциномы [57].

Короткоцепочечные жирные кислоты. КЦЖК являются важными посредниками метаболического сопряжения между кишечной микробиотой и организмом-хозяином. КЦЖК могут воздействовать не только на толстую кишку, но и на различные органы и системы через системный кровоток.

В недавних эпидемиологических исследованиях было установлено, что развитие рака желудка и молочной железы коррелирует с низким содержанием КЦЖК в кале [58]. Также недавние клинические исследования продемонстрировали, что концентрация КЦЖК в стуле больных с колоректальным раком ниже по сравнению со здоровыми людьми. Исследователи объясняют данное наблюдение снижением содержания бактерий, синтезирующих КЦЖК, таких как *Lachnospiraceae*, *Roseburia* spp., *Bifidobacterium* spp., у больных с раком данной локализации [59].

Установлено, что КЦЖК могут значительно снизить риск развития злокачественного новообразования путем ингибирования роста и миграции клеток, подавления гистоновых деацетилаз (HDAC) и индукции апоптоза [60]. К основным КЦЖК относятся бутират, ацетат и пропионат [61]. Установлено, что после внутриклеточного связывания бутирата с HDAC их ферментативная активность подавляется, что приводит к гиперацетилированию гистонов и изменению экспрессии генов. Также бутират может подавлять рост опухолевых клеток путем активации остановки клеточного цикла и апоптоза. Так, в исследовании на мышах, которых колонизировали диким типом бутират-продуцирующих бактерий и которых вскармливали специальной диетой, содержащей пищевые волокна, установили подавление опухолевого роста при условии применения азоксиметана и декстрансульфата натрия в качестве терапевтических средств [62]. Согласно результатам этого исследования, гликолитический метаболизм опухолевых клеток приводит к снижению метаболизма бутирата и его усиленному накоплению в ядре. Высо-

кие внутриядерные уровни бутирата увеличивали ацетилирование гистонов и приводили к усилению апоптоза и снижению клеточной пролиферации. С другой стороны, в мышинной модели онкогенеза кишечника, вызванного мутациями в генах регулятора сигнального пути Wnt (Apc) и опухолевого супрессора, ответственного за репарацию ДНК (Msh2), микробиота и бутират оказывали стимулирующее действие на опухолевый рост [63]. Основным эффектом бутирата в этой модельной системе было стимулирование гиперпролиферации *Msh2*-дефицитных эпителиальных клеток. Таким образом, эффекты КЦЖК обусловлены их способностью специфически активировать определенные сигнальные пути и зависят от генетических особенностей трансформированных клеток и от концентрации бутирата. Эти исследования еще раз указывают на значимость правильной интерпретации результатов анализа микробиома и геномики опухолевых клеток для формирования адекватных диетических рекомендаций для снижения риска развития злокачественных новообразований.

Бутират может влиять на другие процессы, участвующие в эпигенетической регуляции, включая фосфорилирование и метилирование гистонов, метилирование ДНК и гиперацетилирование негистоновых белков [13]. Установлено, что диета с бутиратом натрия уменьшает диарею за счет снижения проницаемости кишечника, так как повышает экспрессию белков плотных контактов — клаудина-3 и окклюдина [64].

Наиболее важными микробными группами, продуцирующими бутират, являются *Faecalibacterium prausnitzii* и *Eubacterium rectal* [65]. Бутират используется митохондриями колоноцитов, что помогает поддерживать здоровый энергетический баланс данных клеток и способствует их пролиферации [66]. Кроме того, бутират индуцирует экспрессию гена *P21*, ингибируя сигнальный путь транскрипционного фактора AP-1 и увеличивая фосфорилирование протоонкогена c-Fos и митоген-активируемой киназы ERK1/2 [67]. Бутират-зависимая активация пути Akt/mTOR в клеточной линии гепатоцеллюлярной карциномы приводит к активации экспрессии аутофагических белков (беклина 1, ATG 5, LC3-II) и аутофагии, индуцированной АФК [68, 69].

Кроме того, бутират подавляет экспрессию микроРНК-92а (miR-92a) через c-Мус, что снижает пролиферацию клеток рака толстой кишки и стимулирует апоптоз [7]. Тогда как гиперэкспрессия miR-92a при раке толстой кишки способствует росту и инвазии

путем нацеливания на *Kruppel*-подобный фактор 4 (KLF4) и нижестоящий p21, а снижение miR-92a может вызывать апоптоз раковых клеток [7].

КЦЖК способны опосредовать иммунорегуляцию через Treg, поэтому проявляют противовоспалительные и антиканцерогенные эффекты [21].

Ацетат и пропионат могут связываться с рецепторами, которые ассоциированы с G-белком — GPR41 и GPR43. Как и в случае с бутиратом, стимулированные через GPR41/43 ацетатом и пропионатом клетки могут запускать сигнальный путь, предотвращающий воспаление и снижающий риск злокачественной трансформации. Противовоспалительные эффекты КЦЖК, обусловленные активацией GPR41/43, показаны на клетках почечного эпителия человека. Так, согласно результатам исследования, КЦЖК снижали стимулирующую TNF- α продукцию хемоаттрактантного белка-1 моноцитов (MCP-1) за счет ингибирования фосфорилирования p38 и JNK. Также было показано, что регуляция воспаления в клеточных линиях человека (HeLa, HEK293) может осуществляться за счет десенсибилизации GPR41/43 под влиянием β -аррестинов. В случае GPR43 β -аррестин блокировал деградацию комплекса NF- κ B с белком-ингибитором I κ B и ядерную транслокацию NF- κ B, что приводило к снижению экспрессии провоспалительных цитокинов — IL-6 и IL-1 β [70].

Суммируя все вышеизложенное, можно отметить, что КЦЖК могут активировать различные клеточные механизмы, связанные с профилактикой канцерогенеза. Это влияние связано с регуляцией сигнальных путей, факторов транскрипции и состояния эпигенома. КЦЖК могут выступать не только как лиганды для трансмембранных рецепторов, но и способны проникать в клетку и напрямую взаимодействовать с внутриклеточными мишенями. Однако важно учитывать, что эффекты КЦЖК могут меняться на противоположные (проканцерогенные) при наличии определенных генетических особенностей опухолевых клеток, а также в зависимости от концентрации КЦЖК в опухолевом микроокружении (рисунок).

ВЛИЯНИЕ МИКРОБИОТИЧЕСКИХ МЕТАБОЛИТОВ НА УСПЕХ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ТЕРАПИИ

Микробиота кишечника значимо влияет на эффективность химиотерапии. В химиотерапевтической практике для лечения некоторых

злокачественных новообразований желудочно-кишечного тракта используется препарат на основе платины — оксалиплатин. На его эффективность влияет взаимодействие микробиоты кишечника и иммунной системы хозяина. Микробиота кишечника стимулирует миелоидные клетки для производства АФК на высоком уровне, а возникающий в результате их действия внутриопухолевый окислительный стресс усиливает повреждения ДНК, связанные с оксалиплатином, что и приводит к гибели опухолевых клеток [71]. Другим примером зависимого от воздействия микробиоты химиопрепарата является циклофосфамид — алкилирующий агент, используемый при гематологических злокачественных новообразованиях и солидных опухолях. Циклофосфамид может повреждать эпителий тонкой кишки, это приводит к нарушению барьерной функции, что, в свою очередь, делает возможным транслокацию кишечных комменсальных микроорганизмов во вторичные лимфоидные органы, где микробы вызывают повышение пула опухоль-ассоциированных антиген-специфических Th17-лимфоцитов [72]. Лечение антибиотиками предотвращает такую транслокацию микробиоты и связанную с ней поляризацию Т-клеток, тем самым ослабляя эффективность противоопухолевой химиотерапии [73].

Успех иммунотерапии (а именно цитокиновой терапии, таргетной иммунотерапии и вакцинотерапии) является одним из самых значимых достижений современной онкологии [74]. Учитывая тесные взаимодействия микробиоты и иммунной системы, вполне ожидаемо, что микробиотические метаболиты влияют на ответ клеток хозяина на иммунотерапию. В качестве одного из доказательств может служить снижение эффективности иммунотерапии CpG-олигонуклеотидами у мышей с подкожными опухолями, опосредованное дисбиозом, возникающим при применении антибиотиков [71]. Учитывая тот факт, что иммунотерапия обладает эффективностью при меланоме, раке мочевого пузыря, почки и легкого, но не при раке толстой кишки (которая наиболее плотно заселена бактериями) [1, 2, 75], особенно остро стоит вопрос о том, каким образом микробиота способствует успеху иммунотерапии.

В исследованиях на мышах было показано, что присутствие таких представителей микробиоты кишечника, как *Bifidobacterium* spp., было способно усиливать эффективность анти-PD1 иммунотерапии [76], тогда как *Bacteroides thetaiotaomicron* и *B. fragilis* были связаны

с усилением эффектов ингибиторов CTLA-4 (клеточный рецептор суперсемейства иммуноглобулинов) [76, 77]. Кроме того, противоопухолевая эффективность анти-PD-1/L1 терапии была связана с несколькими бактериями, включая *Akkermansia*, *Faecalibacterium*, *Clostridia* spp. и *Bifidobacterium* spp. [78]. Эти эффекты отчасти обусловлены воздействием микробных метаболитов, таких как бутират и пропионат. Однако несмотря на то, что в некоторых случаях высокие уровни КЦЖК в кале были связаны с более длительной выживаемостью без прогрессирования или усиленным противоопухолевым ответом, высокие системные уровни КЦЖК, напротив, ассоциированы с плохим ответом на лечение (т.е. неэффективностью терапии) [79]. Бутират также может ограничивать способность дендритных клеток индуцировать опухольспецифичные Т-клетки и Т-клетки памяти, тем самым ограничивая эффективность иммунотерапии против CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4) [80]. Альтернативные пути взаимодействия «микробиом—хозяин» в контексте иммунотерапии злокачественных опухолей включают прямую стимуляцию ДК в лимфатических узлах *Akkermansia muciniphila* [81] или *Bacteroides* spp. посредством индукции противоопухолевого иммунного ответа Th1 и CD8⁺ Т-клеток [77].

Более того, микробиота кишечника, вероятно, влияет и на токсичность иммунотерапии, учитывая развитие тяжелого колита у некоторых пациентов, получающих таргетную терапию [82] (например, антитела к CTLA-4 и PD-L1), и значимую роль кишечных микробов в его патогенезе.

МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ОРКЕСТР МИКРОБИОТИЧЕСКИХ МЕТАБОЛИТОВ ПРИ КАНЦЕРОГЕНЕЗЕ

Безусловно, различные метаболиты микробиоты кишечника оказывают разнонаправленные эффекты в зависимости от их концентрации и наличия и представленности их специфических мишеней — рецепторов. Однако, на наш взгляд, в «метаболомном звездном небе», которое, вне сомнения, отличается у здоровых людей и у больных со злокачественными новообразованиями, имеются свои характерные «созвездия» — специфические молекулярные сдвиги, которые, согласно «эффекту домино», вовлекаются в слаженный и необратимый патологический механизм канцерогенеза.

В результате нарушений физиологии хозяина и состава микробиотического сообщества при инициации канцерогенеза комменсалы могут оказывать патогенное влияние, что приводит к усилению воспаления в кишечнике у хозяина, а также к образованию биопленки [83]. Увеличение *Enterococcus faecalis* и *E. coli* усиливают выработку воспалительных сигнальных молекул (IFN- γ и IL-4) в клетках кишечника, способных индуцировать повышенную экспрессию IDO1 и изменять метаболизм организма больного [84]. *F. nucleatum* вызывает значительно большую экспрессию провоспалительного цитокина TNF- α , что приводит к гиперактивации IDO1 [84]. *F. nucleatum* и *Peptostreptococcus anaerobius* могут прикрепляться к опухолевым клеткам через белки адгезии к клеточной поверхности, активируя путь PI3k/Akt, ведущий к повышенной пролиферации клеток [11]. Следует отметить, что оба вида микроорганизмов также могут продуцировать высокие уровни индолов в результате катаболизма Trp. Следовательно, микробиом является ключевым фактором воспаления именно за счет изменения метаболизма Trp [45].

Важным, в том числе микробиотическим, онкометаболитом является кинуренин. Его образование, как было описано выше, зависит от уровня экспрессии и активности IDO1. В то же время установлено, что экспрессия IDO1 зависит от содержания КЦЖК [47]. Экспериментально подтверждено, что бутират и в меньшей степени пропионат, изобутират, изовалерат и валериат подавляют активность IDO1 в бактериальных супернатантах. При этом снижение уровней КЦЖК в кале и в плазме крови является плохим прогностическим признаком в прогрессии опухоли. Отмечено и снижение уровней Trp и микробных индольных катаболитов, которые выполняют множество протективных функций [47].

Следует отметить различные иммуномодулирующие эффекты бактериальных метаболитов, напрямую влияющие на избегание опухолью иммунного ответа или, напротив, на нацеливание иммунных клеток против клеток опухоли. Так, известно, что макрофаги после активации ЛПС играют важную роль в стимуляции образования и активности инфламмосомы, продуцирующей большие количества провоспалительных цитокинов CCL2, TNF- α , IL-12 и IL-6. В исследовании Nastasi et al. [85] было показано, что бутират и пропионат играют решающую роль в модулировании иммунных ответов в зрелых ДК человека. Согласно результатам исследования, пропионат

и бутират проявляли способность значительно снижать экспрессию и секрецию IL-6. Кроме того, бутират и пропионат снижали индуцированную ЛПС экспрессию генов и продукцию белков IL-12B (IL-12p40), общего компонента для образования как IL-12p40, так и IL-23 [86]. Эти данные позволили авторам выдвинуть гипотезу о том, что обе КЦЖК обуславливают наивную поляризацию Т-клеток, уменьшая провоспалительные функции Th1 и Th17 и, следовательно, сдвигая баланс в сторону формирования противовоспалительных популяций, таких как Treg, при этом ставя под угрозу продукцию IL-12 и IL-23. Кроме того, оказалось, что активность бутирата и пропионата является избирательной, поскольку эти КЦЖК воздействовали на экспрессию первичных генов ответа на ЛПС, (в частности, генов семейства TNF- α и CCL2), в то время как другие гены (например, гены человеческого лейкоцитарного антигена *HLA-DR*, кодирующего рецептор главного комплекса гистосовместимости класса II, *CD86*, *IL1A*, *IL1B*) не были подвержены влиянию или даже активировались под воздействием КЦЖК [85].

Кишечная щелочная фосфатаза обезвреживает ЛПС, катализируя дефосфорилирование активной (токсичной) части липида А, тем самым предотвращая местное воспаление, а также транслокацию активного ЛПС в системный кровоток [37]. Активность данного фермента сильно зависит от уровня свободных аминокислот L-ряда и особенно от уровня L-фенилаланина (Phe) [87]. Дисбиоз и повышение уровня Phe, тирозина (Tyr) и Tgr характерно для микробиоты, которая формирует микробиотическое окружение раковых клеток [88]. В свою очередь, повышение уровня Phe приводит к ингибированию кишечной щелочной фосфатазы, что логично приводит к нарушению дефосфорилирования ЛПС и его активной транслокации в системный кровоток. Через TLR4 и NF- κ B ЛПС формирует провоспалительный и проканцерогенный статус. Провоспалительные цитокины являются регуляторами активности катаболизма Tgr и образования кинуренина. Данная биогенная молекула подавляет иммунный надзор за злокачественной трансформацией клеток. В свою очередь, КЦЖК выступают с защитной функцией, подавляя регуляторный фермент образования кинуренина [47]. Однако возникший, видимо, первично проонкогенный дисбиотический профиль характеризуется снижением числа микроорганизмов, ответственных за продукцию бутирата и других КЦЖК [89]. Кроме того, проонкогенный дисбиотический

профиль характеризуется повышением образования ВтЖК, которые являются факторами агрессии в опухолевой трансформации клеток. Так, ВтЖК ингибируют TLR4-зависимую активацию макрофагов селезенки и кишечника [22] и, таким образом, одновременно с кинуренином подавляют работу иммунокомпетентных клеток и создают благоприятные для иммуносупрессии профили сигнальных молекул и их целевых путей (рисунок).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Фактически все ткани и органы человеческого организма оказываются под влиянием комменсальной микробиоты, населяющей его. Молекулярное сопряжение между бактериальными и эукариотическими клетками, длительно формировавшееся в процессе эволюции, привело к созданию сложной сети взаимодействий, имеющей множество пересечений в виде сигнальных путей, работа которых определяется как метаболитами микробиоты, так и клетками хозяина. Ожидается, микробиота оказывает влияние не только на поддержание физиологических функций, но и вовлечена в патогенез множества заболеваний человека, не исключая злокачественный рост. Неслучайно состояние дисбиоза и полиморфного микробиома признано одной из ключевых особенностей канцерогенеза [90]. Выступая в качестве мутагенов или сигнальных молекул, абберрантно модулирующих работу сигнальных путей хозяина, микробиотические метаболиты могут инициировать злокачественную трансформацию, способствовать прогрессии роста опухоли и ее метастазированию. С другой стороны, многие метаболиты обладают онкопротективным действием, направляя работу иммунной системы хозяина против опухоли или напрямую стимулируя апоптоз и сенесценцию злокачественно трансформированных клеток. Эффективность противоопухолевой терапии также во многом зависит от состава микробиома, а трансплантация микробиоты рассматривается как один из многообещающих подходов к повышению успеха лечения и выживаемости онкологических пациентов [91]. Однако, несмотря на лавинообразное увеличение числа исследований, посвященных роли микробиоты в канцерогенезе, точные механизмы действия микробных метаболитов на организм хозяина остаются непонятными. Мы видим, что некоторые метаболиты (например, бутират) оказывают плеiotропные и разнонаправленные эффекты на разные типы

клеток в зависимости от состояния дифференцировки, определенного генетического фона, концентрации самого метаболита. Более того, эффекты таких регуляторных молекул зачастую находятся под влиянием других сигнальных метаболитов, продуцируемых микробиотой, и опухолевого микроокружения. Изучая возможные варианты действия микробных факторов, в перспективе кажется возможным использование модулирующего потенциала таких метаболитов для борьбы со злокачественными опухолями и повышения эффективности лечения.

Вклад авторов. О.П. Шатова, А.А. Заболотнева – концепция и написание работы; А.В. Шестопалов – редактирование текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена за счет средств госбюджета.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Попова О. П., Шегай П. В., Иванов А. А., Данилова Т. И., Алексеев Б. Я., Каприн А. Д. (2008) Молекулярные механизмы развития рака предстательной железы: корреляция уровней EGF, HGF и VEGF с клинико-морфологическими параметрами, *Мол. Мед.*, **4**, 40-46.
2. Zolotovskaia, M. A., Sorokin, M. I., Petrov, I. V., Poddubskaya, E. V., Moiseev, A. A., Sekacheva, M. I., Borisov, N. M., Tkachev, V. S., Garazha, A. V., Kaprin, A. D., Shegay, P. V., Giese, A., Kim, E., Roumiantsev, S. A., and Buzdin, A. A. (2020) Disparity between inter-patient molecular heterogeneity and repertoires of target drugs used for different types of cancer in clinical oncology, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 1580.
3. Dominguez-Bello, M. G., Godoy-Vitorino, F., Knight, R., and Blaser, M. J. (2019) Role of the microbiome in human development, *Gut*, **68**, 1108-1114, doi: 10.1136/gutjnl-2018-317503.
4. Agus, A., Clément, K., and Sokol, H. (2021) Gut microbiota-derived metabolites as central regulators in metabolic disorders, *Gut*, **70**, 1174-1182, doi: 10.1136/gutjnl-2020-323071.
5. Matson, V., Chervin, C. S., and Gajewski, T. F. (2021) Cancer and the microbiome – influence of the commensal microbiota on cancer, immune responses, and immunotherapy, *Gastroenterology*, **160**, 600-613, doi: 10.1053/j.gastro.2020.11.041.
6. Oh, J. K., and Weiderpass, E. (2014) Infection and cancer: global distribution and burden of diseases, *Ann. Glob. Health*, **80**, 384-392, doi: 10.1016/j.aogh.2014.09.013.
7. Fang, Y., Yan, C., Zhao, Q., Xu, J., Liu, Z., Gao, J., Zhu, H., Dai, Z., Wang, D., and Tang, D. (2021) The roles of microbial products in the development of colorectal cancer, *Bioengineered*, **12**, 720-735, doi: 10.1080/21655979.2021.
8. Chagneau, C. V., Payros, D., Tang-Fichaux, M., Auvray, F., Nougayrède, J. P., and Oswald, E. (2022) The pks island: a bacterial Swiss army knife? Colibactin: beyond DNA damage and cancer, *Trends Microbiol.*, **30**, 1146-1159, doi: 10.1016/j.tim.2022.05.010.
9. Dougherty, M. W., and Jobin, C. (2021) Shining a light on colibactin biology, *Toxins (Basel)*, **13**, 346, doi: 10.3390/toxins13050346.
10. Ansari, S., and Yamaoka, Y. (2019) *Helicobacter pylori* virulence factors exploiting gastric colonization and its pathogenicity, *Toxins (Basel)*, **11**, 677, doi: 10.3390/toxins11110677.
11. Guo, P., Tian, Z., Kong, X., Yang, L., and Shan, X., (2020) FadA promotes DNA damage and progression of *Fusobacterium nucleatum*-induced colorectal cancer through up-regulation of chk2, *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, **39**, 202, doi: 10.1186/s13046-020-01677-w.
12. Tabowei, G., Gaddipati, G. N., Mukhtar, M., Alzubaidee, M. J., Dwarampudi, R. S., Sheena, M., Bichenapally, S., Khachatryan, V., Muazzam, A., Hama, C., Velugoti, L., and Lubna, M. (2022) Microbiota dysbiosis a cause of colorectal cancer or not? *Cureus*, **14**, e30893, doi: 10.7759/cureus.30893.
13. Tsvetkova, S. A., and Koshel, E. I. (2020) Microbiota and cancer: host cellular mechanisms activated by gut microbial metabolites, *Int. J. Med. Microbiol.*, **310**, 151425, doi: 10.1016/j.ijmm.2020.151425.
14. Visekruna, A., and Luu, M. (2021) The role of short-chain fatty acids and bile acids in intestinal and liver function, inflammation, and carcinogenesis, *Front. Cell Dev. Biol.*, **9**, 703218, doi: 10.3389/fcell.2021.703218.
15. Režen, T., Rozman, D., Kovács, T., Kovács, P., Sipos, A., Bai, P., and Miko, E. (2022) The role of bile acids in carcinogenesis, *Cell. Mol. Life Sci.*, **79**, 243, doi: 10.1007/s00018-022-04278-2.
16. Mikó, E., Kovács, T., Sebő, É., Tóth, J., Csonka, T., Ujlaki, G., Sipos, A., Szabo, J., Mehes, G., and Bai, P. (2019) Microbiome microbial metabolome cancer cell interactions in breast cancer familial, but unexplored, *Cells*, **8**, 293, doi: 10.3390/cells8040293.

17. Cai, J., Sun, L., and Gonzalez, F. J. (2022) Gut microbiota-derived bile acids in intestinal immunity, inflammation, and tumorigenesis, *Cell Host Microbe*, **30**, 289-300, doi: 10.1016/j.chom.2022.02.004.
18. Wells, J. E., and Hylemon, P. B. (2000) Identification and characterization of a bile acid 7 α -dehydroxylation operon in *Clostridium* sp. strain TO-931, a highly active 7 α -dehydroxylating strain isolated from human feces, *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**, 1107-1113, doi: 10.1128/AEM.66.3.1107-1113.2000.
19. Biagioli, M., Marchianò, S., Carino, A., di Giorgio, C., Santucci, L., Distrutti, E., and Fiorucci, S. (2021) Bile acids activated receptors in inflammatory bowel disease, *Cells*, **10**, 1281, doi: 10.3390/cells10061281.
20. Cai, X., Young, G. M., and Xie, W. (2021) The xenobiotic receptors PXR and CAR in liver physiology, an update, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.*, **1867**, 166101, doi: 10.1016/j.bbadis.2021.166101.
21. Meng, C., Bai, C., Brown, T. D., Hood, L. E., and Tian, Q. (2018) Human gut microbiota and gastrointestinal cancer, *Genom. Proteom. Bioinform.*, **16**, 33-49, doi: 10.1016/j.gpb.2017.06.002.
22. Fiorucci, S., Biagioli, M., Zampella, A., and Distrutti, E. (2018) Bile acids activated receptors regulate innate immunity, *Front. Immunol.*, **9**, 1853, doi: 10.3389/fimmu.2018.01853.
23. Fiorucci, S., Carino, A., Baldoni, M., Santucci, L., Costanzi, E., Graziosi, L., and Biagioli, M. (2021) Bile acid signaling in inflammatory bowel diseases, *Dig. Dis. Sci.*, **66**, 674-693, doi: 10.1007/s10620-020-06715-3.
24. Davis, S. K., Selva, K. J., Kent, S. J., and Chung, A. W. (2020) Serum IgA Fc effector functions in infectious disease and cancer, *Immunol. Cell Biol.*, **98**, 276-286, doi: 10.1111/imcb.12306.
25. Yang, P., Peng, Y., Feng, Y., Xu, Z., Feng, P., Cao, J., Chen, Y., Chen, X., Cao, X., Yang, Y., and Jie, J. (2021) Immune cell-derived extracellular vesicles — new strategies in cancer immunotherapy, *Front. Immunol.*, **12**, 771551, doi: 10.3389/fimmu.2021.771551.
26. Mirlekar, B. (2022) Tumor promoting roles of IL-10, TGF- β , IL-4, and IL-35: Its implications in cancer immunotherapy, *SAGE Open Med.*, **10**, 20503121211069012, doi: 10.1177/20503121211069012.
27. He, B., Liu, Y., Hoang, T. K., Tian, X., Taylor, C. M., Luo, M., Tran, D. Q., Tatevian, N., and Rhoads, J. M. (2019) Antibiotic-modulated microbiome suppresses lethal inflammation and prolongs lifespan in Treg-deficient mice, *Microbiome*, **7**, 145, doi: 10.1186/s40168-019-0751-1.
28. Hang, S., Paik, D., Yao, L., Kim, E., Trinath, J., Hang, S., Paik, D., Yao, L., Kim, E., Trinath, J., Lu, J., Ha, S., Nelson, B. N., Kelly, S. P., Wu, L., Zheng, Y., Longman, R. S., Rastinejad, F., Devlin, A. S., Krout, M. R., Fischbach, M. A., Littman, D. R., and Huh, J. R. (2019) Author correction: bile acid metabolites control TH17 and Treg cell differentiation, *Nature*, **576**, 143-148, doi: 10.1038/s41586-019-1785-z.
29. Hertli, S., and Zimmermann, P. (2022) Molecular interactions between the intestinal microbiota and the host, *Mol. Microbiol.*, **117**, 1297-1307, doi: 10.1111/mmi.14905.
30. Ma, C., Han, M., Heinrich, B., Fu, Q., Zhang, Q., Sandhu, M., Agdashian, D., Terabe, M., Berzofsky, J. A., Fako, V., Ritz, T., Longerich, T., Theriot, C. M., McCulloch, J. A., Roy, S., Yuan, W., Thovarai, V., Sen, S. K., Ruchirawat, M., Korangy, F., Wang, X. W., Trinchieri, G., and Greten, T. F. (2018) Gut microbiome-mediated bile acid metabolism regulates liver cancer via NKT cells, *Science*, **360**, eaan5931, doi: 10.1126/science.aan5931.
31. Liu, X., Chen, B., You, W., Xue, S., and Qin, H. (2018) The membrane bile acid receptor TGR5 drives cell growth and migration via activation of the JAK2/STAT3 signaling pathway in non-small cell lung cancer, *Cancer Lett.*, **412**, 194-207, doi: 10.1016/j.canlet.2017.10.017.
32. Chen, M., Ye, A., Wei, J., Wang, R., and Poon, K. (2020) Deoxycholic acid upregulates the reprogramming factors KLF4 and OCT4 through the IL-6/STAT3 pathway in esophageal adenocarcinoma cells, *Technol. Cancer Res. Treat.*, **19**, 194-207, doi: 10.1016/j.canlet.2017.10.017.
33. Yasuda, H., Hirata, S., Inoue, K., Mashima, H., Ohnishi, H., and Yoshida, M. (2007) Involvement of membrane-type bile acid receptor M-BAR/TGR5 in bile acid-induced activation of epidermal growth factor receptor and mitogen-activated protein kinases in gastric carcinoma cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **354**, 154-159, doi: 10.1016/j.bbrc.2006.12.168.
34. Huang, W. K., Hsu, H. C., Liu, J. R., Yang, T. S., Chen, J. S., Chang, J. W., Lin, Y. C., Yu, K. H., Kuo, C. F., and See, L. C. (2016) The association of ursodeoxycholic acid use with colorectal cancer risk, *Medicine (Baltimore)*, **95**, e2980, doi: 10.1097/MD.0000000000002980.
35. Heinbockel, L., Weindl, G., Martinez-de-Tejada, G., Correa, W., Sanchez-Gomez, S., Bárcena-Varela, S., Goldmann, T., Garidel, P., Gutschmann, T., and Brandenburg, K. (2018) Inhibition of lipopolysaccharide- and lipoprotein-induced inflammation by antitoxin peptide Pep19-2.5, *Front. Immunol.*, **9**, 1704, doi: 10.3389/fimmu.2018.01704.
36. Sahoo, D. K., Borchering, D. C., Chandra, L., Jergens, A. E., Atherly, T., Bourgois-Mochel, A., Ellinwood, N. M., Snella, E., Severin, A. J., Martin, M., Allenspach, K., and Mochel, J. P. (2022) Differential transcriptomic profiles following stimulation with lipopolysaccharide in intestinal organoids from dogs with inflammatory bowel disease and intestinal mast cell tumor, *Cancers (Basel)*, **14**, 3525, doi: 10.3390/cancers14143525.

37. Ghosh, S. S., Wang, J., Yannie, P. J., and Ghosh, S. (2020) Intestinal barrier dysfunction, LPS translocation, and disease development, *J. Endocr. Soc.*, **4**, bvz039, doi: 10.1210/jendso/bvz039.
38. Cani, P. D., Amar, J., Iglesias, M. A., Poggi, M., Knauf, C., Bastelica, D., Neyrinck, A. M., Fava, F., Tuohy, K. M., Chabo, C., Waget, A., Delmée, E., Cousin, B., Sulpice, T., Chamontin, B., Ferrières, J., Tanti, J. F., Gibson, G. R., Casteilla, L., Delzenne, N. M., Alessi, M. C., and Burcelin, R. (2007) Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance, *Diabetes*, **56**, 1761-1772, doi: 10.2337/db06-1491.
39. Nighot, M., Al-Sadi, R., Guo, S., Rawat, M., Nighot, P., Watterson, M., and Ma, T. (2017) Lipopolysaccharide-induced increase in intestinal epithelial tight permeability is mediated by toll-like receptor 4/myeloid differentiation primary response 88 (MyD88) activation of myosin light chain kinase expression, *Am. J. Pathol.*, **187**, 2698-2710, doi: 10.1016/j.ajpath.2017.08.005.
40. Jain, S., Dash, P., Minz, A. P., Satpathi, S., Samal, A. G., Behera, P., Satpathi, P., and Senapati, S. (2019) Lipopolysaccharide (LPS) enhances prostate cancer metastasis potentially through NF- κ B activation and recurrent dexamethasone administration fails to suppress it *in vivo*, *Prostate*, **79**, 168-182, doi: 10.1002/pros.23722.
41. Zhu, G., Huang, Q., Huang, Y., Zheng, W., Hua, J., Yang, S., Zhuang, Z., Wang, J., and Ye, J. (2016) Lipopolysaccharide increases the release of VEGF-C that enhances cell motility and promotes lymphangiogenesis and lymphatic metastasis through the TLR4–NF- κ B/JNK pathways in colorectal cancer, *Oncotarget*, **7**, 73711-73724, doi: 10.18632/oncotarget.12449.
42. Hand, T. W., Vujkovic-Cvijin, I., Ridaura, V. K., and Belkaid, Y. (2016) Linking the microbiota, chronic disease, and the immune system, *Trends Endocrinol. Metab.*, **27**, 831-843, doi: 10.1016/j.tem.2016.08.003.
43. Zhao, H., Wu, L., Yan, G., Chen, Y., Zhou, M., Wu, Y., and Li, Y. (2021) Inflammation and tumor progression: signaling pathways and targeted intervention, *Signal. Transduct. Target Ther.*, **6**, 263, doi: 10.1038/s41392-021-00658-5.
44. Guo, J., Liao, M., and Wang, J. (2021) TLR4 signaling in the development of colitis-associated cancer and its possible interplay with microRNA-155, *Cell Commun. Signal.*, **19**, 90, doi: 10.1186/s12964-021-00771-6.
45. Venkateswaran, N., and Conacci-Sorrell, M. (2020) Kynurenine: an oncometabolite in colon cancer, *Cell Stress*, **4**, 24-26, doi: 10.15698/cst2020.01.210.
46. Wyatt, M., and Greathouse, K. L. (2021) Targeting dietary and microbial tryptophan-indole metabolism as therapeutic approaches to colon cancer, *Nutrients*, **13**, 1189, doi: 10.3390/nu13041189.
47. Martin-Gallausiaux, C., Larraufie, P., Jarry, A., Béguet-Crespel, F., Marinelli, L., Ledue, F., Reimann, F., Blottiere, H., and Lapaque, N. (2018) Butyrate produced by commensal bacteria down-regulates indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO-1) expression via a dual mechanism in human intestinal epithelial cells, *Front. Immunol.*, **9**, 2838, doi: 10.3389/fimmu.2018.02838.
48. Savitz, J. (2020) The kynurenine pathway: a finger in every pie, *Mol. Psychiatry*, **25**, 131-147, doi: 10.1038/s41380-019-0414-4.
49. Shestopalov, A. V., Shatova, O. P., Karbyshev, M. S., Gaponov, A. M., Moskaleva, N. E., Appolonova, S. A., Tutelyan, A. V., Makarov, V. V., Yudin, S. M., and Roumiantsev, S. A. (2021) “Kynurenine switch” and obesity, *Bull. Sib. Med.*, **20**, 103-111, doi: 10.20538/1682-0363-2021-4-103-111.
50. Venkateswaran, N., Lafita-Navarro, M. C., Hao, Y. H., Kilgore, J. A., Perez-Castro, L., Braverman, J., Borenstein-Auerbach, N., Kim, M., Lesner, N. P., Mishra, P., Brabletz, T., Shay, J. W., DeBerardinis, R. J., Williams, N. S., Yilmaz, O. H., and Conacci-Sorrell, M. (2019) MYC promotes tryptophan uptake and metabolism by the kynurenine pathway in colon cancer, *Genes Dev.*, **33**, 24-26, doi: 10.15698/cst2020.01.210.
51. Triplett, T. A., Garrison, K. C., Marshall, N., Donkor, M., Blazeck, J., Lamb, C., Qerqez, A., Dekker, J. D., Tanno, Y., Lu, W. C., Karamitros, C. S., Ford, K., Tan, B., Zhang, X. M., McGovern, K., Coma, S., Kumada, Y., Yamany, M. S., Sentandreu, E., Fromm, G., Tiziani, S., Schreiber, T. H., Manfredi, M., Ehrlich, L. I., Stone, E., and Georgiou, G. (2018) Reversal of indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated cancer immune suppression by systemic kynurenine depletion with a therapeutic enzyme, *Nat. Biotechnol.*, **36**, 758-764, doi: 10.1038/nbt.4180.
52. Hendriks, T., and Schnabl, B. (2019) Indoles: metabolites produced by intestinal bacteria capable of controlling liver disease manifestation, *J. Intern. Med.*, **286**, 32-40, doi: 10.1111/joim.12892.
53. Chew, S. S., Tan, L. T., Law, J. W., Pusparajah, P., Goh, B. H., Ab Mutalib, N. S., and Lee, L. H. (2020) Targeting gut microbial biofilms – a key to hinder colon carcinogenesis? *Cancers (Basel)*, **12**, 2272, doi: 10.3390/cancers12082272.
54. Alexeev, E. E., Lanis, J. M., Kao, D. J., Campbell, E. L., Kelly, C. J., Battista, K. D., Gerich, M. E., Jenkins, B. R., Walk, S. T., Kominsky, D. J., and Colgan, S. P. (2018) Microbiota-derived indole metabolites promote human and murine intestinal homeostasis through regulation of interleukin-10 receptor, *Am. J. Pathol.*, **188**, 1183-1194, doi: 10.1016/j.ajpath.2018.01.011.
55. Busbee, P. B., Menzel, L., Alrafas, H. R., Dopkins, N., Becker, W., Miranda, K., Tang, C., Chatterjee, S., Singh, U., Nagarkatti, M., and Nagarkatti, P. S. (2020) Indole-3-carbinol prevents colitis and associated microbial dysbiosis in an IL-22-dependent manner, *JCI Insight*, **5**, e127551, doi: 10.1172/jci.insight.127551.

56. Sugimura, N., Li, Q., Chu, E. S., Lau, H. C., Fong, W., Liu, W., Liang, C., Nakatsu, G., Su, A. C., Coker, O. O., Wu, W. K., Chan, F. K., and Yu, J. (2022) *Lactobacillus gallinarum* modulates the gut microbiota and produces anti-cancer metabolites to protect against colorectal tumorigenesis, *Gut*, **71**, 2011-2021, doi: 10.1136/gutjnl-2020-323951.
57. Zhang, X., Coker, O. O., Chu, E. S., Fu, K., Lau, H. C., Wang, Y. X., Chan, A. W., Wei, H., Yang, X., Sung, J. J., and Yu, J. (2021) Dietary cholesterol drives fatty liver-associated liver cancer by modulating gut microbiota and metabolites, *Gut*, **70**, 761-774, doi: 10.1136/gutjnl-2019-319664.
58. Mirzaei, R., Afaghi, A., Babakhani, S., Sohrabi, M. R., Hosseini-Fard, S. R., Babolhavaeji, K., Khani, A. A., Yousefimashouf, R., and Karampoor, S. (2021) Role of microbiota-derived short-chain fatty acids in cancer development and prevention, *Biomed. Pharmacother.*, **139**, 111619, doi: 10.1016/j.biopha.2021.111619.
59. Yusuf, F., Adewiah, S., Syam, A. F., and Fatchiyah, F. (2019) Altered profile of gut microbiota and the level short chain fatty acids in colorectal cancer patients, *J. Physics Conf. Ser.*, **1146**, 012037, doi: 10.1088/1742-6596/1146/1/012037.
60. Yang, Q., Ouyang, J., Sun, F., and Yang, J. (2020) Short-chain fatty acids: a soldier fighting against inflammation and protecting from tumorigenesis in people with diabetes, *Front. Immunol.*, **11**, 590685, doi: 10.3389/fimmu.2020.590685.
61. Sivaprakasam, S., Bhutia, Y. D., Yang, S., and Ganapathy, V. (2018) Short-chain fatty acid transporters: role in colonic homeostasis, *Compr. Physiol.*, **8**, 299-314, doi: 10.1002/cphy.c170014.
62. Donohoe, D. R., Holley, D., Collins, L. B., Montgomery, S. A., Whitmore, A. C., Hillhouse, A., Curry, K. P., Renner, S. W., Greenwalt, A., Ryan, E. P., Godfrey, V., Heise, M. T., Threadgill, D. S., Han, A., Swenberg, J. A., Threadgill, D. W., and Bultman, S. J. (2014) A gnotobiotic mouse model demonstrates that dietary fiber protects against colorectal tumorigenesis in a microbiota- and butyrate-dependent manner, *Cancer Discov.*, **4**, 1387-1397, doi: 10.1158/2159-8290.CD-14-0501.
63. Belcheva, A., Irrazabal, T., Robertson, S. J., Streutker, C., Maughan, H., Rubino, S., Moriyama, E. H., Copeland, J. K., Surendra, A., Kumar, S., Green, B., Geddes, K., Pezo, R. C., Navarre, W. W., Milosevic, M., Wilson, B. C., Girardin, S. E., Wolever, T. M., Edelmann, W., Guttman, D. S., Philpott, D. J., and Martin, A. (2014) Gut microbial metabolism drives transformation of msh2-deficient colon epithelial cells, *Cell*, **158**, 288-299, doi: 10.1016/j.cell.2014.04.051.
64. Feng, W., Wu, Y., Chen, G., Fu, S., Li, B., Huang, B., Wang, D., Wang, W., and Liu, J. (2018) Sodium butyrate attenuates diarrhea in weaned piglets and promotes tight junction protein expression in colon in a GPR109A-dependent manner, *Cell. Physiol. Biochem.*, **47**, 1617-1629, doi: 10.1159/000490981.
65. Li, H. B., Xu, M. L., Xu, X. D., Tang, Y. Y., Jiang, H. L., Li, L., Xia, W. J., Cui, N., Bai, J., Dai, Z. M., Han, B., Li, Y., Peng, B., Dong, Y. Y., Aryal, S., Manandhar, I., Eladawi, M. A., Shukla, R., Kang, Y. M., Joe, B., and Yang, T. (2022) *Faecalibacterium prausnitzii* attenuates CKD via butyrate-renal GPR43 axis, *Circ Res.*, **131**, e120-e134, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.122.320184.
66. Singh, N., Gurav, A., Sivaprakasam, S., Brady, E., Padia, R., Shi, H., Thangaraju, M., Prasad, P. D., Manicassamy, S., Munn, D. H., Lee, J. R., Offermanns, S., and Ganapathy, V. (2014) Activation of Gpr109a, receptor for niacin and the commensal metabolite butyrate, suppresses colonic inflammation and carcinogenesis, *Immunity*, **40**, 128-139, doi: 10.1016/j.immuni.2013.12.007.
67. Pudlo, N. A., Urs, K., Kumar, S. S., German, J. B., Mills, D. A., and Martens, E. C. (2015) Symbiotic human gut bacteria with variable metabolic priorities for host mucosal glycans, *mBio*, **6**, e01282-15, doi: 10.1128/mBio.01282-15.
68. Pant, K., Saraya, A., and Venugopal, S. K. (2017) Oxidative stress plays a key role in butyrate-mediated autophagy via Akt/mTOR pathway in hepatoma cells, *Chem. Biol. Interact.*, **273**, 99-106, doi: 10.1016/j.cbi.2017.06.001.
69. Singh, S., Singh, P. K., and Kumar, A. (2022) Butyrate ameliorates intraocular bacterial infection by promoting autophagy and attenuating the inflammatory response, *Infect. Immun.*, **14**, e0025222, doi: 10.1128/iai.00252-22.
70. Tian, Y., Xu, Q., Sun, L., Ye, Y., and Ji, G. (2018) Short-chain fatty acids administration is protective in colitis-associated colorectal cancer development, *J. Nutr. Biochem.*, **57**, 103-109, doi: 10.1016/j.jnutbio.2018.03.007.
71. Iida, N., Dzutsev, A., Stewart, C. A., Smith, L., Bouladoux, N., Weingarten, R. A., Molina, D. A., Salcedo, R., Back, T., Cramer, S., Dai, R. M., Kiu, H., Cardone, M., Naik, S., Patri, A. K., Wang, E., Marincola, F. M., Frank, K. M., Belkaid, Y., Trinchieri, G., and Goldszmid, R. S. (2013) Commensal bacteria control cancer response to therapy by modulating the tumor microenvironment, *Science*, **342**, 967-970, doi: 10.1126/science.1240527.
72. Daillère, R., Vétizou, M., Waldschmitt, N., Yamazaki, T., Isnard, C., Poirier-Colame, V., Duong, C. P. M., Flament, C., Lepage, P., Roberti, M. P., Routy, B., Jacquilot, N., Apetoh, L., Becharef, S., Rusakiewicz, S., Langella, P., Sokol, H., Kroemer, G., Enot, D., Roux, A., Eggermont, A., Tartour, E., Johannes, L., Woerther, P. L., Chachaty, E., Soria, J. C., Golden, E., Formenti, S., Plebanski, M., Madondo, M., Rosenstiel, P., Raoult, D., Cattoir, V., Boneca, I. G.,

- Chamaillard, M., and Zitvogel, L. (2016) *Enterococcus hirae* and *Barnesiella intestinihominis* facilitate cyclophosphamide-induced therapeutic immunomodulatory effects, *Immunity*, **45**, 931-943, doi: 10.1016/j.immuni.2016.09.009.
73. Viaud, S., Saccheri, F., Mignot, G., Yamazaki, T., Daillère, R., Hannani, D., Enot, D. P., Pfirschke, C., Engblom, C., Pittet, M. J., Schlitzer, A., Ginhoux, F., Apetoh, L., Chachaty, E., Woerther, P. L., Eberl, G., Bérard, M., Ecobichon, C., Clermont, D., Bizet, C., Gaboriau-Routhiau, V., Cerf-Bensussan, N., Opolon, P., Yessaad, N., Vivier, E., Ryffel, B., Elson, C. O., Doré, J., Kroemer, G., Lepage, P., Boneca, I. G., Ghiringhelli, F., and Zitvogel, L. (2013) The intestinal microbiota modulates the anticancer immune effects of cyclophosphamide, *Science*, **342**, 971-976, doi: 10.1126/science.1240537.
74. Bagchi, S., Yuan, R., and Engleman, E. G. (2021) Immune checkpoint inhibitors for the treatment of cancer: clinical impact and mechanisms of response and resistance, *Annu. Rev. Pathol. Mech. Disease*, **16**, 223-249, doi: 10.1146/annurev-pathol-042020-042741.
75. Lichtenstern, C. R., Ngu, R. K., Shalapour, S., and Karin, M. (2020) Immunotherapy, inflammation and colorectal cancer, *Cells*, **9**, 1310, doi: 10.3390/jcms18061310.
76. Sivan, A., Corrales, L., Hubert, N., Williams, J. B., Aquino-Michaels, K., Earley, Z. M., Benyamin, F. W., Lei, Y. M., Jabri, B., Alegre, M. L., Chang, E. B., and Gajewski, T. F. (2015) Commensal Bifidobacterium promotes antitumor immunity and facilitates anti-PD-L1 efficacy, *Science*, **350**, 1084-1089, doi: 10.1126/science.aac4255.
77. Vétizou, M., Pitt, J. M., Daillère, R., Lepage, P., Waldschmitt, N., Flament, C., Rusakiewicz, S., Routy, B., Roberti, M. P., Duong, C. P., Poirier-Colame, V., Roux, A., Becharef, S., Formenti, S., Golden, E., Cording, S., Eberl, G., Schlitzer, A., Ginhoux, F., Mani, S., Yamazaki, T., Jacquelot, N., Enot, D. P., Bérard, M., Nigou, J., Opolon, P., Eggermont, A., Woerther, P. L., Chachaty, E., Chaput, N., Robert, C., Mateus, C., Kroemer, G., Raoult, D., Boneca, I. G., Carbonnel, F., Chamaillard, M., and Zitvogel, L. (2015) Anticancer immunotherapy by CTLA-4 blockade relies on the gut microbiota, *Science*, **350**, 1079-1084, doi: 10.1126/science.aad1329.
78. Gopalakrishnan, V., Helmink, B. A., Spencer, C. N., Reuben, A., and Wargo, J. A. (2018) The influence of the gut microbiome on cancer, immunity, and cancer immunotherapy, *Cancer Cell*, **33**, 570-580, doi: 10.1016/j.ccell.2018.03.015.
79. Hayase, E., and Jenq, R. R. (2021) Role of the intestinal microbiome and microbial-derived metabolites in immune checkpoint blockade immunotherapy of cancer, *Genome Med.*, **13**, 107, doi: 10.1186/s13073-021-00923-w.
80. Coutzac, C., Jouniaux, J. M., Paci, A., Schmidt, J., Mallardo, D., Seck, A., Asvatourian, V., Cassard, L., Saulnier, P., Lacroix, L., Woerther, P. L., Vozy, A., Naigeon, M., Nebot-Bral, L., Desbois, M., Simeone, E., Mateus, C., Boselli, L., Grivel, J., Soularue, E., Lepage, P., Carbonnel, F., Ascierto, P. A., Robert, C., and Chaput, N. (2020) Systemic short chain fatty acids limit antitumor effect of CTLA-4 blockade in hosts with cancer, *Nat. Commun.*, **11**, 2168, doi: 10.1038/s41467-020-16079-x.
81. Routy, B., le Chatelier, E., Derosa, L., Duong, C. P., Alou, M. T., Daillère, R., Fluckiger, A., Messaoudene, M., Rauber, C., Roberti, M. P., Fidelle, M., Flament, C., Poirier-Colame, V., Opolon, P., Klein, C., Iribarren, K., Mondragón, L., Jacquelot, N., Qu, B., Ferrere, G., Clémenson, C., Mezquita, L., Masip, J. R., Naltet, C., Brosseau, S., Kaderbhai, C., Richard, C., Rizvi, H., Levenez, F., Galleron, N., Quinquis, B., Pons, N., Ryffel, B., Minard-Colin, V., Gonin, P., Soria, J. C., Deutsch, E., Lorient, Y., Ghiringhelli, F., Zalcman, G., Goldwasser, F., Escudier, B., Hellmann, M. D., Eggermont, A., Raoult, D., Albiges, L., Kroemer, G., and Zitvogel, L. (2018) Gut microbiome influences efficacy of PD-1-based immunotherapy against epithelial tumors, *Science*, **359**, 91-97, doi: 10.1126/science.aan3706.
82. Gedye, C., van der Westhuizen, A., and John, T. (2015) Checkpoint immunotherapy for cancer: superior survival, unaccustomed toxicities, *Intern. Med. J.*, **45**, 696-701, doi: 10.1111/imj.12653.
83. Sadrekarimi, H., Gardanova, Z. R., Bakhshesh, M., Ebrahimzadeh, F., Yaseri, A. F., Thangavelu, L., Hasanpoor, Z., Zadeh, F. A., and Kahrizi, M. S. (2022) Emerging role of human microbiome in cancer development and response to therapy: special focus on intestinal microflora, *J. Transl. Med.*, **20**, 301, doi: 10.1186/s12967-022-03492-7.
84. Waclawiková, B., and el Aidy, S. (2018) Role of microbiota and tryptophan metabolites in the remote effect of intestinal inflammation on brain and depression, *Pharmaceuticals*, **11**, 63, doi: 10.3390/ph11030063.
85. Nastasi, C., Candela, M., Bonefeld, C. M., Geisler, C., Hansen, M., Krejsgaard, T., Biagi, E., Andersen, M. H., Brigidi, P., Odum, N., Litman, T., and Woetmann, A. (2015) The effect of short-chain fatty acids on human monocyte-derived dendritic cells, *Sci. Rep.*, **5**, 16148, doi: 10.1038/srep16148.
86. Oppmann, B., Lesley, R., Blom, B., Timans, J. C., Xu, Y., Hunte, B., Vega, F., Yu, N., Wang, J., Singh, K., Zonin, F., Vaisberg, E., Churakova, T., Liu, M., Gorman, D., Wagner, J., Zurawski, S., Liu, Y., Abrams, J. S., Moore, K. W., Rennick, D., de Waal-Malefyt, R., Hannum, C., Bazan, J. F., and Kastelein, R. A. (2000) Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities

- similar as well as distinct from IL-12, *Immunity*, **13**, 715-725, doi: 10.1016/s1074-7613(00)00070-4.
87. Jafari, B., Ospanov, M., Ejaz, S. A., Yelibayeva, N., Khan, S. U., Amjad, S. T., Safarov, S., Abilov, Z. A., Turmukhanova, M. Z., Kalugin, S. N., Ehlers, P., Lecka, J., Sévigny, J., Iqbal, J., and Langer, P. (2018) 2-Substituted 7-trifluoromethyl-thiadiazolopyrimidones as alkaline phosphatase inhibitors. Synthesis, structure activity relationship and molecular docking study, *Eur. J. Med. Chem.*, **144**, 116-127, doi: 10.1016/j.ejmech.2017.11.068.
 88. Xu, H., Liu, L., Xu, F., Liu, M., Song, Y., Chen, J., Zhan, H., Zhang, Y., Xu, D., Chen, Y., Lu, M., and Chen, D. (2022) Microbiome-metabolome analysis reveals cervical lesion alterations, *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*, **54**, 1552-1560, doi: 10.3724/abbs.2022149.
 89. Eslami, M., Sadrifar, S., Karbalaee, M., Keikha, M., Kobylak, N. M., Yousefi, B. (2020) Importance of the microbiota inhibitory mechanism on the Warburg effect in colorectal cancer cells, *J. Gastro-intest. Cancer*, **51**, 738-747, doi: 10.1007/s12029-019-00329-3.
 90. Hanahan, D. (2022) Hallmarks of cancer: new dimensions, *Cancer Discov.*, **12**, 31-46, doi: 10.1158/2159-8290.CD-21-1059.
 91. Zhang, J., Wu, K., Shi, C., and Li, G. (2022) Cancer immunotherapy: fecal microbiota transplantation brings light, *Curr. Treat. Options Oncol.*, **23**, 1777-1792, doi: 10.1007/s11864-022-01027-2.

MOLECULAR ORCHESTRA OF MICROBIOTIC METABOLITES IN THE SCENARIO OF CARCINOGENESIS

Review

O. P. Shatova^{1,2*}, A. A. Zabolotneva¹, and A. V. Shestopalov^{1,3}

¹ Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Medicine,
Pirogov Russian National Research Medical University, 117997 Moscow, Russia; e-mail: shatova.op@gmail.com

² Peoples's Friendship University of Russia (RUDN University), 117198 Moscow, Russia

³ Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology,
Ministry of Health of the Russian Federation, 117997 Moscow, Russia

The mechanisms of carcinogenesis are extremely complex. Many players determine the scenario of malignant cell transformation, tumor growth and metastasis. In recent decades, more and more attention has been paid to the role of the symbiotic human microbiota in the regulation of metabolism and the functioning of the immune system of the host organism. Such a symbiosis of a macroorganism and its microorganisms was combined into the concept of a holoorganism. In the process of coevolution of the participants of the holoorganism, the ways of their interaction were formed, and the metabolites of the microbiota acquired a special role — signaling molecules and the main regulators of molecular interactions in the holoorganism. Being involved in the signaling pathways of the host, bacterial metabolites turned out to be obligatory participants in both physiological and pathological processes, including tumor growth. At the same time, the effects of signaling metabolites often have a multidirectional character, manifested in the impact both on the functions of the host cells and on the metabolic activity and composition of the microbiome. This review discusses the role of some microbiotic metabolites in the induction and prevention of the process of malignant transformation of cells in the host organism, as well as their influence on the effectiveness of anticancer therapy. We have tried to draw the reader's attention to the role of some components of the molecular orchestra of microbial metabolites in the initiation and progression of tumor growth.

Keywords: microbiota, carcinogenesis, signaling metabolites, cancer

НАСЛЕДСТВЕННЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ, АССОЦИИРОВАННЫЕ С ПОВЫШЕННЫМ РИСКОМ РАЗВИТИЯ ОПУХОЛЕЙ ДЕТСКОГО ВОЗРАСТА

Обзор

© 2023 Е.Н. Суспицын^{1,2*}, Е.Н. Имянитов^{1,2}

¹ Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Петрова, 197758 Санкт-Петербург, Россия; электронная почта: evgeny.suspitsin@gmail.com

² Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, 194100 Санкт-Петербург, Россия

Поступила в редакцию 31.01.2023

После доработки 16.03.2023

Принята к публикации 18.03.2023

Распространение технологий секвенирования нового поколения позволило установить, что значительная часть онкологической заболеваемости у детей связана с моногенными наследственными болезнями. Предрасположенность к развитию новообразований детского возраста характерна для широкого круга состояний, включая наследственные опухолевые синдромы, первичные иммунодефициты, расопатии и факоматозы. Механизмы молекулярного патогенеза неоплазм многообразны и включают нарушения сигнальных каскадов, дефекты репарации ДНК, процессы ремоделирования хроматина и процессинга микроРНК. Своевременная диагностика синдромов с повышенным риском развития опухолей крайне важна для эффективного лечения пациентов, медико-генетического консультирования семей и разработки программ профилактического наблюдения. В обзоре описан спектр новообразований, характерных для наиболее распространённых синдромов, а также возможные патогенетические механизмы их развития.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: опухоли детского возраста, мутации, расопатии, факоматозы, первичные иммунодефициты.

DOI: 10.31857/S0320972523070035, **EDN:** FUVWQB

ВВЕДЕНИЕ

Большинство опухолей возникает в результате накопления критического числа соматических мутаций, затрагивающих онкогены и гены-супрессоры опухолевого роста в каком-либо клоне клеток. В ряде случаев высокий риск развития новообразований обусловлен мутациями, полученными от родителей, и наследуется как моногенный менделевский признак. Хорошо известен ряд семейных опухолевых синдромов — заболеваний, при которых опухоли являются главным и единственным проявлением генетической патологии. Как правило, такие заболевания впервые манифестируют у взрослых. В качестве примеров можно приве-

сти наследственный неполипозный рак толстой кишки (синдром Линча), наследственный рак молочной железы и яичников, семейная медуллярная карцинома щитовидной железы и т.д. Эти заболевания неплохо изучены, разработаны методы их диагностики, подходы к лечению и профилактическому наблюдению. При этом становится очевидным, что повышенный риск новообразований также характерен для целого ряда наследственных заболеваний детского возраста. Данные, полученные методом высокопроизводительного секвенирования нового поколения, свидетельствуют о том, что около 10% детских опухолей возникает на фоне наследственных дефектов, связанных с теми или иными генетическими синдромами [1–3].

Принятые сокращения: ВЭБ — вирус Эпштейна–Барр; ЗППР — задержка психоречевого развития; ПИД — первичные иммунодефициты; ЮММЛ — ювенильный миеломоноцитарный лейкоз.

* Адресат для корреспонденции.

Спектр новообразований у детей существенно отличается от такового у взрослых. В то время как у последних преобладают солидные опухоли эпителиального происхождения, в детском возрасте чаще диагностируются гематологические опухоли (лейкозы и лимфомы), опухоли головного и спинного мозга (медуллобластома, рабдоидные опухоли, глиомы), бластомы (ретинобластома, нефробластома, нейробластома) и саркомы (остеосаркома, саркома Юинга) [4]. Эти новообразования могут возникать в структуре широкого круга наследственных заболеваний, включая «классические» опухолевые синдромы, первичные иммунодефицитные состояния, факотомозы, синдромы с макросомией, расопатии и т.д. К другим особенностям детских опухолей можно отнести низкую мутационную нагрузку (т.е. относительно небольшое число мутаций, выявляемых в опухолевой ткани), а также повышенную частоту соматических транслокаций, приводящих к образованию химерных белков с онкогенными свойствами [5].

Предлагаются различные критерии, на основании которых можно выявить детей с онкологическими заболеваниями, нуждающихся в молекулярно-генетическом исследовании с целью поиска наследственных мутаций [6–8]. К ним относятся, в частности, выявление первично-множественных опухолей, обнаружение у ребёнка любой опухоли «взрослого» типа (рак толстой кишки, рак яичников и т.д.), наличие лицевых дизморфий, врождённых пороков различных органов, задержки психоречевого развития (ЗПРР), нарушений роста, кожных пигментаций, гематологических нарушений, иммунодефицита, а также необычно тяжёлая токсичность в ходе лекарственного лечения и/или лучевой терапии. Также считается, что факт наличия опухоли некоторых гистологических типов (атипичная тератоидно-рабдоидная опухоль, медуллобластома, гепатобластома и т.д.) с высокой вероятностью указывает на наличие у ребёнка наследственного дефекта [6, 9].

В некоторых случаях подтип опухоли достаточно чётко ассоциирован с определёнными наследственными заболеваниями: например, гиподиплоидный острый лимфобластный лейкоз характерен для синдрома Ли–Фраумени [2], а SHN-подтип медуллобластомы — для синдрома Горлина с мутациями *SUFU* [10]. Однако большинство разновидностей опухолей не являются абсолютно специфичными для конкретных синдромов. Так, одна из наиболее частых опухолей детского возраста, опухоль Вильмса (нефробла-

стома), обычно возникает спорадически, но также может являться частью клинических проявлений целого ряда заболеваний генетической природы [11, 12]. Среди синдромальных форм опухоли Вильмса можно выделить синдромы Беквита–Видеманна, WAGR (Wilms tumor, Aniridia, Genitourinary abnormalities, and mental Retardation), Дениса–Драша, Фрейзера, Перлмана, Симпсона–Голаби–Бемеля, анемию Фанкони; реже эта опухоль встречается у больных с синдромами Блума, *DICER1*, Ли–Фраумени, нанизмом Мулибрей, *PIK3CA*-ассоциированными синдромами [12]. В 10% изолированных случаев опухоли Вильмса выявляются наследственные мутации в генах *REST*, *CHEK1*, *EP300*, *PALB2*, *ARID1A* [13].

«КЛАССИЧЕСКИЕ» ОПУХОЛЕВЫЕ СИНДРОМЫ

Ретинобластома — злокачественная опухоль сетчатки, возникающая из примитивных ретинальных стволовых клеток или предшественников колбочек (табл. 1). Наблюдение за пациентами с этим заболеванием позволило Альфреду Кнудсону в 1971 г. сформулировать так называемую «2-ударную» гипотезу канцерогенеза. Согласно его предположению, для развития наследственной ретинобластомы требуется два генетических события: унаследованная мутация одного аллеля (первый «удар») и последующая соматическая инактивация другого аллеля (второй «удар») в процессе развития сетчатки. Эта гипотеза блестяще подтвердилась после открытия в 1986 г. гена *RBI* и демонстрации его биаллельной инактивации в клетках опухоли [14]. Белок является негативным регулятором клеточного цикла; мутации приводят к потере функции и неконтролируемой пролиферации клеток [15]. Ген стал первым идентифицированным геном-супрессором опухолевого роста и послужил архетипическим примером роли подобных генов в канцерогенезе.

Синдром Ли–Фраумени был описан более 50 лет назад. Со временем классические критерии синдрома были существенно дополнены: в частности, выяснилось, что наличие семейного анамнеза, отягощённого в отношении ранних раков или сарком, не является обязательным [16]. В то же время большое диагностическое значение имеет выявление редких разновидностей педиатрических опухолей (табл. 1); вероятность обнаружения наследственных мутаций *TP53* особенно велика в случае адренокортикальных карцином,

Таблица 1. Классические опухолевые синдромы

Синдром	Ген	Основные разновидности опухолей, возникающие в детском возрасте
Синдром Ли–Фраумени	<i>TP53</i>	карцинома коры надпочечников, глиобластома, астроцитомы, эпендимомы, карцинома сосудистого сплетения, супратенториальные примитивные нейроэктодермальные опухоли, рабдомиосаркома, остеосаркома нижней челюсти, медуллобластома, гиподиплоидный острый лимфобластный лейкоз, лимфомы
Наследственная ретинобластома	<i>RB1</i>	ретинобластома
Синдром Горлина	<i>PTCH1</i> , <i>SUFU</i>	медуллобластома (особенно у носителей мутаций <i>SUFU</i>), базальноклеточные карциномы кожи
Врожденный синдром дефицита репарации неспаренных оснований (CMMRD)	<i>MLH1</i> , <i>MSH2</i> , <i>MSH6</i> , <i>PMS2</i> , <i>EPCAM</i>	лимфомы, острый лимфобластный и миелобластный лейкозы, пиломатриксомы, глиобластома, астроцитомы, супратенториальные примитивные нейроэктодермальные опухоли, медуллобластома, колоректальный рак
Синдром злокачественных рабдоидных опухолей	<i>SMARCB1</i> , <i>SMARCA4</i>	атипичная тератоидно-рабдоидная опухоль ЦНС, экстракраниальные злокачественные рабдоидные опухоли (головы и шеи, паравerteбральных мышц, печени, мочевого пузыря, средостения, брюшной полости, таза, сердца, почек), мелкоклеточная карцинома яичников гиперкальцемического типа
DICER1-ассоциированный опухолевый синдром	<i>DICER1</i>	плевропульмональная бластома, кистозная нефрома; реже — медуллоэпителиома цилиарного тела, назальная хондромезенхимальная гамартома, эмбриональная рабдомиосаркома, бластома гипофиза, пинеобластома, саркома ЦНС, пресакральная злокачественная тератоидная опухоль

карцином сосудистого сплетения [17] и анапластических рабдомиосарком [18]. Белок p53 является «стражем генома»: в ответ на повреждения ДНК он инициирует транскрипцию многочисленных генов, вовлеченных в регуляцию клеточного цикла, ДНК-репарации, апоптоза и метаболизма. По-видимому, до 1,5% детских опухолей связаны с герминальными мутациями *TP53* [3]; в то же время интерпретация клинического значения наследственных вариантов этого гена сложна ввиду достаточно высокой популяционной частоты и различной пенетрантности [16].

Синдром Горлина связан с наследственными мутациями в генах *Patched1* (*PTCH1*) и *Suppressor of fused* (*SUFU*), ассоциированных с SHH (Sonic Hedgehog)-опосредованным сигнальным каскадом. Продукт *PTCH1* является рецептором для SHH; связывание этих молекул ведёт к изменению активности Smo (smoothened). В норме *PTCH1* является репрессором Smo; в случае мутации активируется сигнальный комплекс, состоящий из Gli-1 (glioma-associated oncogene) и *SUFU*. В опухолях продемонстрирована потеря гетерозиготности по нормальному аллелю *SUFU* и *PTCH1*

и активация SHH-сигналинга, ведущая, в частности, к ингибированию апоптоза [19].

Подавляющее большинство наследственных опухолевых синдромов имеет аутосомно-доминантный тип наследования. К немногочисленным исключениям относится синдром конституционального дефекта репарации неспаренных оснований (constitutional mismatch repair deficiency, CMMRD). Как известно, гетерозиготные мутации генов mismatch-репарации (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*) являются причиной карцином толстой кишки и эндометрия в структуре синдрома Линча [20]. Биаллельные повреждения этих генов встречаются гораздо реже и ассоциированы с развитием широкого спектра опухолей (в первую очередь гематологических опухолей и неоплазм мозга) с очень ранним дебютом. Наличие у пациентов кофейных пятен на коже, узелков Лиша на радужке, а также нейрофибром придаёт этому заболеванию сходство с нейрофиброматозом типа I. Наблюдается определённая ассоциация между генотипом и фенотипом: так, гематологические опухоли чаще возникают у детей с дефектами *MLH1* и *MSH2*, чем у обладателей мутаций *MSH6* и *PMS2*, в то время как для

последних более характерны новообразования головного мозга [21].

Синдром предрасположенности к рабдоидным опухолям ассоциирован с мутациями субъединиц АТР-зависимого хроматин-ремоделирующего комплекса SWI/SNF (BAF), задействованного в процессах дифференцировки клеток и поддержании плюрипотентности стволовых клеток [22]. Очевидно, что развитие новообразований не связано с нарушением стабильности генома, так как для рабдоидных опухолей характерна необычно низкая мутационная нагрузка [23]. Учитывая, что упомянутый комплекс взаимодействует с промоторами огромного числа генов, механизм образования опухолей, по-видимому, не связан с каким-то одним сигнальным каскадом, а скорее вызван эпигенетическими нарушениями транскрипционной регуляции [24].

Ген *DICER1*, ассоциированный с широким спектром доброкачественных и злокачественных опухолей детского возраста, играет важную роль в трансляции белков. Его продукт представляет собой РНКазу III, которая необходима для производства микроРНК путём разрезания пре-микроРНК или двунитевой РНК. В свою очередь, микроРНК, взаимодействуя с мРНК, задействованы в регуляции экспрессии более 30% всех генов, кодирующих белки [25]. Большинство опухолей в структуре этого синдрома возникают в результате сочетания наследственной мутации типа loss-of-function и приобретённой соматической миссенс-мутации в одной из пяти «горячих точек» РНКазного домена IIIb [26]. У пациентов с плевропульмональной бластомой и другими опухолями описан также мозаицизм по миссенс-мутациям в тех же «горячих точках», причём он ассоциирован с более тяжёлым течением заболевания, ранним началом и формированием первично-множественных опухолей [27].

ПЕРВИЧНЫЕ ИММУНОДЕФИЦИТЫ

Первичные иммунодефициты (ПИД) или врождённые ошибки иммунитета представляют собой крайне гетерогенную группу генетически детерминированных дефектов иммунной системы, приводящих к повышенной частоте инфекционных, онкологических и аутоиммунных осложнений [28, 29]. До 25% детей с первичными иммунодефицитами страдают злокачественными новообразованиями [30]; более того, онкологические заболевания являются второй по значимости причиной смерти пациентов с ПИД после инфекций [31].

Нередко развитие опухоли является одним из первых клинических проявлений иммунодефицита. Около 60–70% опухолей, возникающих на фоне ПИД, представлены лимфомами и лейкозами [32].

Риск развития опухоли сильно варьирует в зависимости от конкретной формы ПИД [29]. Высокий онкологический риск характерен для пациентов с нарушениями гуморального иммунитета (общая вариабельная иммунная недостаточность, X-сцепленная агаммаглобулинемия), клеточного иммунитета (тяжёлая комбинированная иммунная недостаточность, X-сцепленный лимфопролиферативный синдром, синдром Вискотта–Олдрича), а также дефектами репарации ДНК. У большинства больных ПИД с опухолевыми проявлениями в той или иной степени нарушена функция В-лимфоцитов, тогда как функция Т-клеток может быть полностью или частично сохранной. Существующие данные свидетельствуют, что пациенты с первичными дефектами антителообразования, как правило, демонстрируют наибольшее количество патогенетических компонентов, необходимых для процесса канцерогенеза (hallmarks of cancer) [33].

Несмотря на то что важным условием, способствующим развитию опухолей, является снижение противоопухолевого иммунного надзора, внутренние причины онкологической предрасположенности у больных ПИД не являются универсальными. К ним относятся многообразные нарушения процессов дифференцировки, апоптоза, сигнальных взаимодействий, метаболизма и реорганизации цитоскелета клеток иммунной системы, а также механизмов сохранения хромосомной стабильности, поддержания длины теломера и репарации ДНК [34, 35].

Кроме того, важную роль играет нарушение защиты от вирусов. В частности, вирус Эпштейна–Барр (ВЭБ) причастен к патогенезу ряда лимфопролиферативных заболеваний, гематологических опухолей и некоторых карцином [36]. ВЭБ имеет повышенную тропность к В-лимфоцитам, чем и объясняется преобладание В-клеточных ВЭБ-ассоциированных лимфом. Вирус Эпштейна–Барр запускает избыточную пролиферацию антител-продуцирующих В-клеток, за которой следует индукция клеточного иммунного ответа, связанного с цитотоксическими Т-клетками. Отсутствие нормального цитотоксического ответа ведёт к ВЭБ-опосредованной пролиферации В-клеток. Например, при X-сцепленном лимфопролиферативном синдроме дефект белка SAP, ассоциированного с сигнальной

лимфоцит-активирующей молекулой (SLAM), приводит к серьёзному нарушению функции цитотоксических лимфоцитов, в то время как у здоровых индивидуумов носительство ВЭБ обычно бессимптомно. Другая форма лимфо-пролиферативного синдрома связана с наследственным дефектом гена *XIAP*. Продукт этого гена ингибирует каспазы, препятствуя апоптозу клеток; нарушение функции приводит к иммунному дисбалансу и хроническому воспалению, преимущественно за счёт гиперэкспансии вирус-специфических Т-лимфоцитов в ответ на ВЭБ-инфекцию [37].

Синдром Вискотта—Олдрича относится к комбинированным иммунодефицитам и ассоциирован с мутациями гена *WAS*. Продукт этого гена участвует в реорганизации актинового цитоскелета, необходимой для формирования иммунологических синапсов, обеспечения цитотоксичности натуральных киллеров (NK), хемотаксиса и хемотаксиса [38].

Повышенный риск развития опухолей при дефектах репарации двунитевых разрывов ДНК связан со снижением эффективности иммунного надзора вследствие дефектов развития Т- и В-клеток, уменьшения разнообразия клонального репертуара, нарушения пролиферации лимфоцитов, трансформации В-клеток, а также их иммортализации под воздействием вируса Эпштейна—Барр [39]. Возможна также прямая индукция точечных мутаций, транслокаций и процесса хромотрепсиса [40], нарушающих стабильность генома и повышающих вероятность злокачественной трансформации.

Многие разновидности ПИД связаны с нарушением таких важных процессов, затрагивающих Т- и В-лимфоциты, как V(D)J-рекомбинация, переключение классов антител и соматическая гипермутация [41]. Эти события, подразумевающие эндогенную генерацию и последующее устранение двунитевых разрывов ДНК, критически необходимы для нормального развития и созревания иммунной системы.

В частности, V(D)J-рекомбинация иницируется связыванием молекул RAG1 и RAG2 с сигнальными последовательностями, фланкирующими V-, D- и J-участки. Образуются двунитевые разрывы ДНК, концы которых стабилизируются шпилечными структурами [42]. После фосфорилирования каталитической субъединицей ДНК-протеинкиназным комплексом (DNA-РКс), к устранению шпилек привлекается белок Artemis, кодируемый геном *DCLRE1C* и обладающий эндонуклеазной активностью [43]. Мутации, вызывающие поте-

рю функции *RAG1/2* или *DCLRE1C*, нарушая нормальное развитие Т- и В-лимфоцитов, являются причиной тяжёлых комбинированных иммунодефицитов. Двунитевые разрывы ликвидируются за счёт привлечения белковых участников нехомологичного связывания концов ДНК (Non-Homologous End-Joining, NHEJ), дефекты некоторых из вовлечённых в эти процессы молекул (Artemis, DNA-РКс, LIG4, Cernunnos) также ассоциированы с некоторыми разновидностями ПИД.

Отдельного внимания заслуживают синдромы с хромосомной нестабильностью, связанные в первую очередь с распознаванием двунитевых разрывов ДНК [44]. Наиболее высок риск новообразований у пациентов с атаксией-телеангиэктазией (табл. 2): опухоли отмечаются у 25% больных [45]. Продукт гена *ATM* служит сенсором при распознавании двунитевых разрывов ДНК; мутации приводят к снижению способности к активации контрольных точек (checkpoints) клеточного цикла в ответ на воздействие ионизирующего излучения [46]. Особенно часто возникают лейкозы и лимфомы — риск этих заболеваний в десятки и даже сотни раз превышает популяционный [47]. К сожалению, прогноз при развитии опухолей, как правило, весьма неблагоприятен: если обычно показатель 5-летней продолжительности жизни у детей с лимфомой Ходжкина превышает 90%, средняя выживаемость пациентов с атаксией-телеангиэктазией составляет около 3 месяцев независимо от наличия или отсутствия лечения [47, 48].

Синдром Блума (табл. 2) связан с биаллельными мутациями гена *BLM*, кодирующего протеин из 1417 аминокислот, принадлежащий к подсемейству ДНК-хеликаз RecQ. Белок BLM играет важную роль в поддержании стабильности генома, являясь сенсором повреждения ДНК и рекрутируя другие белки репарации в место дефекта [49]. Хеликаза BLM обеспечивает точность гомологичной рекомбинации, разрушая структуры Холлидея (Holliday junctions) и, таким образом, предотвращая кроссинговер между сестринскими хроматидами [50]. Кроме того, она управляет регрессией остановленной вилки репликации [51]. Описано участие BLM в поддержании структуры теломер [52]. Нарушение функции хеликазы приводит к высокому уровню гомологичной рекомбинации хромосом. Это выражается в повышенном числе обменов несестринских хроматид, увеличении числа квадрирадиальных конфигураций в культуре лимфоцитов и появлении хромосомных разрывов и перестроек, что может быть обнаружено при

Таблица 2. Первичные иммунодефициты

Заболевание	Гены	Симптомы	Основные разновидности опухолей, возникающие в детском возрасте
Тяжёлая комбинированная иммунная недостаточность (ТКИН)	<i>IL2RG, JAK3, ADA, IL7RA, RAG1, RAG2, DCLRE1C/Artemis, NHEJ1/Cernunnos, ZAP70</i>	тяжёлые инфекции дыхательного и пищеварительного тракта, кандидоз, хроническая диарея, снижение массы и роста, инфекции, вызванные условно патогенными микроорганизмами	неходжкинские и ходжкинские лимфомы, ВЭБ-ассоциированная лимфома, лимфома Беркитта, лейкозы, множественные лейомиомы почек и лёгких
Синдром Вискотта—Олдрича	<i>WAS</i>	склонность к кровотечениям, экзема, рекуррентные бактериальные и вирусные инфекции, микротромбоцитопения	В-клеточная лимфома, лейкопения, астроцитомы, саркома Капоши, лейомиомы
Х-Сцепленный лимфопрлиферативный синдром	<i>SH2D1A, XIAP</i>	тяжёлое течение ВЭБ-инфекции и других вирусных инфекций, гемофагоцитарный лимфогистиоцитоз	ходжкинские и неходжкинские лимфомы
Атаксия-телеангиэктазия	<i>ATM</i>	прогрессирующая атаксия, дизартрия, окуломоторная апраксия, хореоатетоз, телеангиэктазии конъюнктивы и кожи, частые инфекции	лимфомы, лейкозы
Синдром Блума	<i>BLM</i>	пре- и постнатальная задержка роста, дефицит подкожной жировой клетчатки, эритема лица и открытых участков кожи после инсоляции, инфекции среднего уха, верхних дыхательных путей и лёгких	острый лимфобластный и миелобластный лейкозы, лимфомы, опухоль Вильмса, медуллобластома
Синдром Ниймегена	<i>NBN</i>	микроцефалия, задержка внутриутробного развития, низкорослость, отставание в психомоторном развитии, рецидивирующие респираторные инфекции	лимфомы (преимущественно В-клеточные), острый лимфобластный и миелобластный лейкозы, опухоли мозга (медуллобластома, глиома), рабдомиосаркома
Анемия Фанкони	более 20 генов <i>FANC</i>	низкий рост, микроцефалия, пигментация кожи, скелетные мальформации верхних и нижних конечностей, аномалии мочеполового тракта, панцитопения	острый миелобластный и лимфобластный лейкозы

цитогенетических исследованиях. Карциномы молочной железы, ассоциированные с дефектом *BLM*, не демонстрируют потерь гетерозиготности (LOH) локуса *BLM*, что предполагает развитие опухолей по механизму гаплонедостаточности [53, 54].

Пациенты с синдромом Ниймегена (Nijmegen breakage syndrome) обладают характерным фенотипом (низкорослость, «птичье» лицо, микроцефалия) и имеют тяжёлые нарушения гуморального и клеточного иммунитета [55]. Белок нибрин (*NBN/NBS1*) входит в структуру комплекса *MRE11–RAD50–NBS1* (*MRN*), играющего важнейшую роль в ответе

на основные виды клеточного стресса: повреждение ДНК в виде двунитевых разрывов, остановку репликационных вилок, дисфункцию теломер и внедрение вирусов [56]. Примечательно, что практически все пациенты с синдромом Ниймегена гомозиготны по аллелю *NBN* с.657_661del5, который с высокой частотой встречается в странах Восточной Европы, в том числе в России [57, 58]. Соматическая утрата нормального аллеля, по-видимому, нехарактерна для опухолей, возникающих у носителей мутаций *NBN/NBS1* [54, 59].

Больные анемией Фанкони имеют разнообразные клинические проявления, включая

низкорослость, пятна на коже, микроцефалию, аномалии верхних и нижних конечностей, панцитопению. Характерна высокая частота гематологических и солидных опухолей; наиболее часто встречается острый миелобластный лейкоз [60]. Заболевание обладает очень высокой генетической гетерогенностью. Описано более 20 генов, ответственных за развитие анемии Фанкони; подавляющее большинство случаев наследуются по аутосомно-рецессивному типу. Функция белков анемии Фанкони связана с репарацией межцепочечных кросс-линков ДНК, препятствующих репликации, а также с регуляцией контрольных точек клеточного цикла и ремоделирования репликационных вилок в ответ на клеточный стресс [61]. Таким образом, нарушение работы этих молекул приводит к нестабильности генома и способствует туморогенезу.

Примечательно, что биаллельное повреждение генов *ATM*, *NBN*, *BLM*, *FANC* является непосредственной причиной генетических заболеваний детского возраста, сочетающих в себе как инфекционные, так и опухолевые проявления, тогда как для гетерозигот (носителей мутаций) характерен повышенный риск некоторых солидных опухолей с поздней манифестацией [62–65].

РАСОПАТИИ

Расопатии — группа заболеваний, связанных с гиперактивацией компонентов сигнального каскада RAS/MAPK, который играет ключевую роль в процессах роста, пролифе-

рации, дифференцировки и апоптоза клеток. К расопатиям относятся аутосомно-доминантные синдромы Нунан и Костелло, кардио-фацио-кожный синдром, CBL-синдром, характеризующиеся пропорциональной низкорослостью и специфическими особенностями лица (табл. 3).

Повышенный онкологический риск типичен не для всех заболеваний этой группы. До 10% пациентов с синдромом Нунан в детском возрасте страдают транзиторными миелопролиферативными заболеваниями. В большинстве случаев состояние самопроизвольно излечивается, но у некоторых пациентов происходит прогрессия в ювенильный миеломоноцитарный лейкоз (ЮММЛ). Переход в лейкоз характерен для пациентов с мутациями *PTPN11* и *KRAS*, но не с дефектами других генов [66]. Ген *PTPN11* кодирует нерецепторную тирозинфосфатазу SHP2. Дефекты *PTPN11* являются наиболее частой причиной синдрома Нунан; мутации, как правило, приводят к постоянной активации каталитического РТР-домена SHP2, усиливая активность сигнального каскада RAS/MAPK [67]. Мутации *KRAS* приводят к активации того же сигнального каскада двумя путями — за счёт сниженной внутренней или GAP-зависимой ГТРАЗНОЙ активности либо посредством изменения аффинности гуаниновых нуклеотидов к RAS-белку [68].

К расопатиям относят и такое распространённое заболевание как нейрофиброматоз типа I, ассоциированный с мутациями в гене *NF1*. Продукт этого гена, нейрофибромин, является негативным регулятором RAS;

Таблица 3. Синдромы с макросомией

Заболевание	Гены	Симптомы	Основные разновидности опухолей, возникающие в детском возрасте
Синдром Беквита—Видеманна	регион 11p15.5 (нарушения импринтинга, делеции и дупликации); мутации <i>CDKN1C</i>	макросомия, гемигиперплазия, макроглоссия, омфалоцеле, висцеромегалия, неонатальная гипогликемия	опухоль Вильмса, гепатобластома; реже — эмбриональная рабдомиосаркома и аденокортикальный рак
Синдром Симпсона—Голаби—Бемеля	<i>GPC3</i> , <i>GPC4</i>	макросомия, дефекты брюшной стенки, макроглоссия, дизморфии лица, задержка психоречевого развития (ЗППР), врождённый порок сердца	опухоль Вильмса, гепатобластома, гепатоцеллюлярная карцинома
Синдром Перлмана	<i>DIS3L2</i>	водянка плода, постнатальный асцит; неонатальная макросомия, гемигиперплазия, дизморфии лица, макроцефалия, гиперинсулинизм	опухоль Вильмса

нарушение функции ведёт к сниженной GTPазной активности белка и, следовательно, к избыточной активности GTP-связанных белков семейства RAS [69].

СИНДРОМЫ С МАКРОСОМИЕЙ

Синдром Беквита—Видеманна характеризуется макросомией, гемигиперплазией, макроглоссией и дефектами брюшной стенки (табл. 4). Наиболее частой причиной данного синдрома является нарушение импринтинга хромосомной области 11p15.5; реже выявляются мутации *CDKN1C*, затрагивающие материнский аллель [70]. У пациентов более чем в 600 раз повышена вероятность нефробластомы (опухоли Вильмса); также встречаются гепатобластомы, реже — нейробластома, эмбриональная рабдомиосаркома и опухоли коры надпочечников [71].

Патогенез опухолей связан с арестом созревания клеток в специфических клеточных популяциях во время определённых периодов эмбрионального развития, т.е. с прерыванием нормального процесса нефрогенеза. В зависимости от этапа, когда произошло нарушение, нефробластома будет содержать разные пропорции бластемного, эпителиального и стромального компонентов. Наибольший риск развития опухоли Вильмса характерен для варианта синдрома Беквита—Видеманна, вызван-

ного гиперметилированием центра импринтинга (IC1) или однородительской дисомией 11p15.5. В результате усиливается экспрессия инсулиноподобного фактора роста IGF2 с последующей гиперактивацией сигнального каскада, способствующего росту и пролиферации клеток [72]. В то же время онкологический риск у пациентов с синдромом Беквита—Видеманна, связанным с утратой метилирования центра импринтинга 2 (IC2), значительно ниже [73].

Х-Сцепленный синдром Симпсона—Голаби—Бемеля во многих отношениях сходен с синдромом Беквита—Видеманна. К специфическим проявлениям можно отнести гипертелоризм, грубые черты лица, задержку умственного развития. В основе патогенеза лежит дефект биосинтеза гепарансульфатных протеогликанов на поверхности клеток. Показана функциональная роль глипикана-3 (продукта гена *GPC3*) в качестве негативного регулятора экспрессии IGF2 и FGF2 [74]. У больных наиболее высок риск опухоли Вильмса, но описаны и случаи других опухолей (гепатобластомы, печеночно-клеточной карциномы) [75].

Гораздо реже встречается синдром Перлмана — аутосомно-рецессивное заболевание, связанное с мутациями *DIS3L2*. Продукт этого гена является компонентом экзосомного комплекса и, обладая 3'→5'-экзорибонуклеазной активностью, регулирует процессинг и деградацию РНК [76]. Для болезни характерна

Таблица 4. Расопатии

Заболевание	Гены	Симптомы	Основные разновидности опухолей, возникающие в детском возрасте
Синдром Нунан	<i>PTPN11, SOS1, RAF1, RIT1, KRAS, NRAS, BRAF, MAP2K1, RRAS, RASA2, A2ML1, SOS2, LZTR1</i>	низкорослость, врождённые пороки сердца, дизморфии лица, кардиомиопатия	ювенильный миеломоноцитарный лейкоз (ЮММЛ), острый лимфобластный лейкоз, дизэмбриопластическая нейроэпителиальная опухоль, нейробластома, рабдомиосаркома
Синдром Костелло	<i>HRAS</i>	дизморфии лица, ЗППР, кардиомиопатия, папилломы	эмбриональная рабдомиосаркома, нейробластома, рак мочевого пузыря
СВЛ-синдром	<i>CBL</i>	фенотип, напоминающий синдром Нунан	ЮММЛ
Нейрофиброматоз типа I (болезнь Реклингхаузена)	<i>NF1</i>	множественные кофейные пятна на коже, веснушки в области подмышек и паха, нейрофибромы, узелки Лиша	глиомы зрительного нерва, опухоли периферических нервов (нейрофибромы, злокачественные опухоли из оболочек периферических нервов), феохромоцитомы, гастроинтестинальные стромальные опухоли, ЮММЛ, остеосаркома, рабдомиома

Таблица 5. Факоматозы

Заболевание	Гены	Симптомы	Основные разновидности опухолей, возникающие в детском возрасте
Туберозный склероз	<i>TSC1</i> , <i>TSC2</i>	гипопигментные пятна на коже, ангиофибромы лица, ЗППР, эпилепсия	субэпендимальная гигантоклеточная астроцитома (СЭГА), рабдомиомы сердца
Нейрофиброматоз типа II	<i>NF2</i>	единичные кофейные пятна на коже, вестибулярные шванномы (патогномоничный признак)	шванномы, менингиомы, эпендимомы, глиомы

очень высокая перинатальная смертность, а среди выживших отмечается высокий риск опухоли Вильмса [77].

ФАКОМАТОЗЫ

Факоматозы (от греч. Phakos — пятно) или нейрокожные дерматозы представляют группу заболеваний с вовлечением производных эмбриональной эктодермы, как правило, с поражением кожи и ЦНС (табл. 5).

Туберозный склероз — достаточно частое генетическое заболевание, которое характеризуется развитием гамартом различных органов (головного мозга, почек, кожи, сердца, сетчатки глаз, лёгких) и имеет аутосомно-доминантный тип наследования. Гены туберозного склероза, *TSC1* и *TSC2*, относятся к классическим супрессорам опухолевого роста. Белок гамартин (продукт гена *TSC1*) в комплексе с туберином (продукт *TSC2*) являются негативными регуляторами mTOR-опосредованного пути сигнальной трансдукции, который играет важнейшую роль в регуляции роста, размера, формы и пролиферации клеток. Мутации приводят к повышению активности комплекса mTORC1, что, в свою очередь, способствует повышению трансляции белка, ускорению роста клеток, усилению синтеза нуклеотидов и снижению аутофагии [78]. Наблюдения, полученные в отношении опухолей, возникающих в структуре туберозного склероза, свидетельствуют, что их патогенез укладывается в «2-ударную модель» канцерогенеза. Помимо наследственного дефекта *TSC1* или *TSC2*, в некоторых соматических клетках происходит делеция второго, неповреждённого аллеля, что приводит к образованию опухоли (гамартомы) соответствующего органа [79, 80].

Нейрофиброматоз типа II характеризуется развитием билатеральных вестибулярных шванном; на коже пациентов наблюдаются немногочисленные кофейные пятна. В основе патогенеза лежат мутации гена *NF2*, кодирую-

щего белок мерлин, вовлечённый в стабилизацию цитоскелета за счёт ингибирования сигнальных каскадов PI3K/Akt, Raf/MEK/ERK и mTOR [81]. Хотя механизм развития опухолей не вполне ясен, для вестибулярных шванном и менингиом продемонстрирован феномен потери гетерозиготности по локусу *NF2* [82].

ОСОБЕННОСТИ ЛЕЧЕНИЯ

Знание молекулярного патогенеза детских опухолей представляется важным в отношении нескольких практических аспектов. Так, лечение некоторых новообразований может сопровождаться крайне выраженной токсичностью или нечувствительностью к проводимому лечению [4]. Кроме того, проведённая лекарственная или лучевая терапия может индуцировать развитие вторичных опухолей. Подобная ситуация, в частности, описана при синдроме Ли–Фраумени [17, 83], ретинобластоме [84] и нейрофиброматозе типа I [85]. При лечении пациентов с дефектами ДНК-репарации, например, с синдромом Блума, атаксией-телеангиэктазией, анемией Фанкони, синдромом Ниймегена, рекомендуется использование редуцированных доз химиотерапии и исключение лучевой терапии [86, 87]. Лечение опухолей у пациентов с ПИД требует контроля инфекций, например пневмонии, вызванной *Pneumocystis jirovecii* [88].

В некоторых случаях удалось разработать таргетные препараты, воздействующие на ключевые сигнальные пути. Яркими примерами являются MEK-ингибитор селуметиниб, применяемый у больных с нейрофиброматозом типа I [69] или эверолимус — ингибитор mTOR с успешным опытом использования для лечения туберозного склероза [89] и расопатий [90].

Ведётся разработка стратегий скрининга опухолевых синдромов у детей [91]. Скрининг считается необходимым в случае, если шанс развития опухоли в детском возрасте превышает 5% [92]. Результаты наблюдения детей

с синдромом Ли–Фраумени и синдромом Беквита–Видеманна демонстрируют, что раннее выявление опухолей ведёт к значимому улучшению общей выживаемости [93, 94].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучение опухолей, возникающих в структуре наследственных синдромов, позволяет расширить имеющиеся представления о причинах развития новообразований детского возраста. Своевременное выявление носительства герминальных мутаций повышает вероятность ранней или даже досимптоматической диагностики, даёт возможность оценки риска развития заболевания у родственников пациентов, а также стимулирует разработку таргетной терапии. Подробное описание «молекулярных портретов» опухолей позволит надеяться на открытие новых прогностических и предиктивных маркеров, способствующих персонализации лечения. В то же время низ-

кая мутационная нагрузка, в целом, характерная для опухолей детского возраста, свидетельствует о необходимости более тщательного исследования нарушений процессов эпигенетической регуляции, таких как метилирование гистонов и CpG-островков. Очевидно, что перспективы изучения педиатрических новообразований связаны с интеграцией данных, полученных с помощью геномных, транскриптомных и эпигеномных подходов.

Вклад авторов. Е.Н.И. — исходная концепция работы, обсуждение и доработка; Е.Н.С. — написание манускрипта.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-45-08004).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием человека или лабораторных животных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Parsons, D. W., Roy, A., Yang, Y., Wang, T., Scollon, S., Bergstrom, K., Kerstein, R. A., Gutierrez, S., Petersen, A. K., Bave, A., Lin, F. Y., López-Terrada, D. H., Monzon, F. A., Hicks, M. J., Eldin, K. W., Quintanilla, N. M., Adesina, A. M., Mohila, C. A., Whitehead, W., Jea, A., Vasudevan, S. A., Nuchtern, J. G., Ramamurthy, U., McGuire, A. L., Hilsenbeck, S. G., Reid, J. G., Muzny, D. M., Wheeler, D. A., Berg, S. L., Chintagumpala, M. M., Eng, C. M., Gibbs, R. A., and Plon, S. E. (2016) Diagnostic yield of clinical tumor and germline whole-exome sequencing for children with solid tumors, *JAMA Oncol.*, **2**, 616-624, doi: 10.1001/jamaoncol.2015.5699.
2. Zhang, J., Walsh, M. F., Wu, G., Edmonson, M. N., Gruber, T. A., Easton, J., Hedges, D., Ma, X., Zhou, X., Yergeau, D. A., Wilkinson, M. R., Vadodaria, B., Chen, X., McGee, R. B., Hines-Dowell, S., Nuccio, R., Quinn, E., Shurtleff, S. A., Rusch, M., Patel, A., Becksfort, J. B., Wang, S., Weaver, M. S., Ding, L., Mardis, E. R., Wilson, R. K., Gajjar, A., Ellison, D. W., Pappo, A. S., Pui, C. H., Nichols, K. E., and Downing, J. R. (2015) Germline mutations in predisposition genes in pediatric cancer, *N. Engl. J. Med.*, **373**, 2336-2346, doi: 10.1056/nejmoa1508054.
3. Gröbner, S. N., Worst, B. C., Weischenfeldt, J., Buchhalter, I., Kleinheinz, K., Rudneva, V. A., Johann, P. D., Balasubramanian, G. P., Segura-Wang, M., Brabetz, S., Bender, S., Hutter, B., Sturm, D., Pfaff, E., Hübschmann, D., Zipprich, G., Heinold, M., Eils, J., Lawrenz, C., Erkek, S., Lambo, S., Waszak, S., Blattmann, C., Borkhardt, A., Kuhlen, M., Eggert, A., Fulda, S., Gessler, M., Wegert, J., Kappler, R., Baumhoer, D., Burdach, S., Kirschner-Schwabe, R., Kontny, U., Kulozik, A. E., Lohmann, D., Hettmer, S., Eckert, C., Bielack, S., Nathrath, M., Niemeyer, C., Richter, G. H., Schulte, J., Siebert, R., Westermann, F., Molenaar, J. J., Vassal, G., Witt, H., ICGC PedBrain-Seq Project, ICGC MMML-Seq Project, Burkhardt, B., Kratz, C. P., Witt, O., van Tilburg, C. M., Kramm, C. M., Fleischhack, G., Dirksen, U., Rutkowski, S., Frühwald, M., von Hoff, K., Wolf, S., Klingebiel, T., Koscielniak, E., Landgraf, P., Koster, J., Resnick, A. C., Zhang, J., Liu, Y., Zhou, X., Waanders, A. J., Zwijnenburg, D. A., Raman, P., Brors, B., Weber, U. D., Northcott, P. A., Pajtler, K. W., Kool, M., Piro, R. M., Korbel, J. O., Schlesner, M., Eils, R., Jones, D. T. W., Lichter, P., Chavez, L., Zapatka, M., and Pfister, S. M. (2018) The landscape of genomic alterations across childhood cancers, *Nature*, **555**, 321-327, doi: 10.1038/nature25480.
4. Kratz, C. P., Jongmans, M. C., Cavé, H., Wimmer, K., Behjati, S., Guerrini-Rousseau, L., Milde, T., Pajtler, K. W., Golmard, L., Gauthier-Villars, M., Jewell, R., Duncan, C., Maher, E. R., Brugieres, L., Pritchard-Jones, K., and Bourdeaut, F. (2021) Predisposition to cancer in children and adolescents, *Lancet Child Adolesc. Heal.*, **5**, 142-154, doi: 10.1016/S2352-4642(20)30275-3.

5. Filbin, M., and Monje, M. (2019) Developmental origins and emerging therapeutic opportunities for childhood cancer, *Nat. Med.*, **25**, 367-376, doi: 10.1038/s41591-019-0383-9.
6. Jongmans, M. C. J., Loeffen, J. L. C. M., Waanders, E., Hoogerbrugge, P. M., Ligtenberg, M. J., Kuiper, R. P., and Hoogerbrugge, N. (2016) Recognition of genetic predisposition in pediatric cancer patients: an easy-to-use selection tool, *Eur. J. Med. Genet.*, **59**, 116-125, doi: 10.1016/J.EJMG.2016.01.008.
7. Kesserwan, C., Friedman Ross, L., Bradbury, A. R., and Nichols, K. E. (2016) The advantages and challenges of testing children for heritable predisposition to cancer, *Am. Soc. Clin. Oncol. Educ. B.*, **35**, 251-269, doi: 10.1200/EDBK_160621.
8. Goudie, C., Witkowski, L., Cullinan, N., Reichman, L., Schiller, I., Tachdjian, M., Armstrong, L., Blood, K. A., Brossard, J., Brunga, L., Cacciotti, C., Caswell, K., Cellot, S., Clark, M. E., Clinton, C., Coltin, H., Felton, K., Fernandez, C. V., Fleming, A. J., Fuentes-Bolanos, N., Gibson, P., Grant, R., Hammad, R., Harrison, L. W., Irwin, M. S., Johnston, D. L., Kane, S., Lafay-Cousin, L., Lara-Corrales, I., Larouche, V., Mathews, N., Meyn, M. S., Michaeli, O., Perrier, R., Pike, M., Punnett, A., Ramaswamy, V., Say, J., Somers, G., Tabori, U., Thibodeau, M. L., Toupin, A. K., Tucker, K. M., van Engelen, K., Vairy, S., Waespe, N., Warby, M., Wasserman, J. D., Whitlock, J. A., Sinnett, D., Jabado, N., Nathan, P. C., Shlien, A., Kamihara, J., Deyell, R. J., Ziegler, D. S., Nichols, K. E., Dendukuri, N., Malkin, D., Villani, A., and Foulkes, W. D. (2021) Performance of the McGill Interactive Pediatric OncoGenetic Guidelines for identifying cancer predisposition syndromes, *JAMA Oncol.*, **7**, 1806-1814, doi: 10.1001/JAMAONCOL.2021.4536.
9. Postema, F. A. M., Hopman, S. M. J., Aalfs, C. M., Berger, L. P. V., Bleeker, F. E., Dommering, C. J., Jongmans, M. C. J., Letteboer, T. G. W., Olderode-Berends, M. J. W., Wagner, A., Hennekam, R. C., and Merks, J. H. M. (2017) Childhood tumours with a high probability of being part of a tumour predisposition syndrome; reason for referral for genetic consultation, *Eur. J. Cancer*, **80**, 48-54, doi: 10.1016/j.ejca.2017.04.021.
10. Brugières, L., Remenieras, A., Pierron, G., Varlet, P., Forget, S., Byrde, V., Bombled, J., Puget, S., Caron, O., Dufour, C., Delattre, O., Bressac-de Paillerets, B., and Grill, J. (2012) High frequency of germline SUFU mutations in children with desmoplastic/nodular medulloblastoma younger than 3 years of age, *J. Clin. Oncol.*, **30**, 2087-2093, doi: 10.1200/JCO.2011.38.7258.
11. Кулева С. А., Имянитов Е. Н. (2017) Опухоль Вильмса: синдромальная и молекулярная диагностика, *Онкопедиатрия*, **4**, 283-289, doi: 10.15690/onco.v4i4.1814.
12. Treger, T. D., Chowdhury, T., Pritchard-Jones, K., and Behjati, S. (2019) The genetic changes of Wilms tumour, *Nat. Rev. Nephrol.*, **15**, 240-251, doi: 10.1038/S41581-019-0112-0.
13. Gadd, S., Huff, V., Walz, A. L., Ooms, A. H. A. G., Armstrong, A. E., Gerhard, D. S., Smith, M. A., Auvil, J. M. G., Meerzaman, D., Chen, Q. R., Hsu, C. H., Yan, C., Nguyen, C., Hu, Y., Hermida, L. C., Davidsen, T., Gesuwan, P., Ma, Y., Zong, Z., Mungall, A. J., Moore, R. A., Marra, M. A., Dome, J. S., Mullighan, C. G., Ma, J., Wheeler, D. A., Hampton, O. A., Ross, N., Gastier-Foster, J. M., Arold, S. T., and Perlman, E. J. (2017) A Children's Oncology Group and TARGET initiative exploring the genetic landscape of Wilms tumor, *Nat. Genet.*, **49**, 1487-1494, doi: 10.1038/ng.3940.
14. Friend, S. H., Horowitz, J. M., Gerber, M. R., Wang, X. F., Bogenmann, E., Li, F. P., and Weinberg, R. A. (1987) Deletions of a DNA sequence in retinoblastomas and mesenchymal tumors: organization of the sequence and its encoded protein, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 9059-9063, doi: 10.1073/PNAS.84.24.9059.
15. Mendoza, P. R., and Grossniklaus, H. E. (2015) The biology of retinoblastoma, *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.*, **134**, 503-516, doi: 10.1016/BS.PMBTS.2015.06.012.
16. Frebourg, T., Bajalica Lagercrantz, S., Oliveira, C., Magenheimer, R., Evans, D. G., and European Reference Network GENTURIS (2020) Guidelines for the Li-Fraumeni and heritable TP53-related cancer syndromes, *Eur. J. Hum. Genet.*, **28**, 1379-1386, doi: 10.1038/S41431-020-0638-4.
17. Bougeard, G., Renaux-Petel, M., Flaman, J. M., Charbonnier, C., Fermey, P., Belotti, M., Gauthier-Villars, M., Stoppa-Lyonnet, D., Consolino, E., Brugières, L., Caron, O., Benusiglio, P. R., Bressac-de Paillerets, B., Bonadona, V., Bonaïti-Pellié, C., Tinat, J., Baert-Desurmont, S., and Frebourg, T. (2015) Revisiting Li-Fraumeni syndrome from TP53 mutation carriers, *J. Clin. Oncol.*, **33**, 2345-2352, doi: 10.1200/JCO.2014.59.5728.
18. Hettmer, S., Archer, N. M., Somers, G. R., Novokmet, A., Wagers, A. J., Diller, L., Rodriguez-Galindo, C., Teot, L. A., and Malkin, D. (2014) Anaplastic rhabdomyosarcoma in TP53 germline mutation carriers, *Cancer*, **120**, 1068-1075, doi: 10.1002/cncr.28507.
19. Foulkes, W. D., Kamihara, J., Evans, D. G. R., Brugières, L., Bourdeaut, F., Molenaar, J. J., Walsh, M. F., Brodeur, G. M., and Diller, L. (2017) Cancer surveillance in Gorlin syndrome and rhabdoid tumor predisposition syndrome, *Clin. Cancer. Res.*, **23**, e62-e67, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-17-0595.
20. Yanus, G. A., Akhapkina, T. A., Iyevleva, A. G., Kornilov, A. V., Suspitsin, E. N., Kuligina, E. S., Ivantsov, A. O., Aleksakhina, S. N., Sokolova, T. N., Sokolenko, A. P., Togo, A. V., and Imyanitov, E. N.

- (2020) The spectrum of Lynch syndrome-associated germ-line mutations in Russia, *Eur. J. Med. Genet.*, **63**, 103753, doi: 10.1016/j.ejmg.2019.103753.
21. Wimmer, K., Kratz, C. P., Vasen, H. F. A., Caron, O., Colas, C., Entz-Werle, N., Gerdes, A. M., Goldberg, Y., Ilencikova, D., Muleris, M., Duval, A., Lavoine, N., Ruiz-Ponte, C., Slavc, I., Burkhardt, B., Brugieres, L., and EU-Consortium Care for CMMRD (C4CMMRD) (2014) Diagnostic criteria for constitutional mismatch repair deficiency syndrome: suggestions of the European consortium "care for CMMRD" (C4CMMRD), *J. Med. Genet.*, **51**, 355-365, doi: 10.1136/JMEDGENET-2014-102284.
 22. Wilson, B. G., and Roberts, C. W. M. (2011) SWI/SNF nucleosome remodellers and cancer, *Nat. Rev. Cancer*, **11**, 481-492, doi: 10.1038/NRC3068.
 23. Lee, R. S., Stewart, C., Carter, S. L., Ambrogio, L., Cibulskis, K., Sougnez, C., Lawrence, M. S., Auclair, D., Mora, J., Golub, T. R., Biegel, J. A., Getz, G., and Roberts, C. W. (2012) A remarkably simple genome underlies highly malignant pediatric rhabdoid cancers, *J. Clin. Invest.*, **122**, 2983-2988, doi: 10.1172/JCI64400.
 24. Kim, K. H., and Roberts, C. W. M. (2014) Mechanisms by which SMARCB1 loss drives rhabdoid tumor growth, *Cancer Genet.*, **207**, 365-372, doi: 10.1016/J.CANCERGEN.2014.04.004.
 25. González, I. A., Stewart, D. R., Schultz, K. A. P., Field, A. P., Hill, D. A., and Dehner, L. P. (2022) DICER1 tumor predisposition syndrome: an evolving story initiated with the pleuropulmonary blastoma, *Mod. Pathol.*, **35**, 4-22, doi: 10.1038/S41379-021-00905-8.
 26. De Kock, L., Wu, M. K., and Foulkes, W. D. (2019) Ten years of DICER1 mutations: provenance, distribution, and associated phenotypes, *Hum. Mutat.*, **40**, 1939-1953, doi: 10.1002/HUMU.23877.
 27. Hill, D. A., Brenneman, M., Field, A., Williams, G., Doros, L., Rossi, C., Schultz, K. A., Rosenberg, A., Ivanovich, J., Turner, J., Gordish-Dressman, H., Stewart, D., Yu, W., Harris, A., Schoettler, P., Goodfellow, P., Dehner, L., Messinger, Y., and Hill, D. A. (2015) Temporal order of RNase IIIb and loss-of-function mutations during development determines phenotype in pleuropulmonary blastoma / DICER1 syndrome: a unique variant of the two-hit tumor suppression model, *F1000Res.*, **4**, 214, doi: 10.12688/F1000RESEARCH.6746.2.
 28. Suspitsin, E. N., Guseva, M. N., Kostik, M. M., Sokolenko, A. P., Skripchenko, N. V., Levina, A. S., Goleva, O. V., Dubko, M. F., Tumakova, A. V., Makhova, M. A., Lyazina, L. V., Bizin, I. V., Sokolova, N. E., Gabrusskaya, T. V., Ditkovskaya, L. V., Kozlova, O. P., Vahliarskaya, S. S., Kondratenko, I. V., and Imyaninov, E. N. (2020) Next-generation sequencing analysis of consecutive Russian patients with clinical suspicion of inborn errors of immunity, *Clin. Genet.*, **98**, 231-239, doi: 10.1111/cge.13789.
 29. Tiri, A., Masetti, R., Conti, F., Tignanelli, A., Turrini, E., Bertolini, P., Esposito, S., Pession, A. (2021) Inborn errors of immunity and cancer, *Biology (Basel)*, **10**, 313, doi: 10.3390/biology10040313.
 30. Salavoura, K., Kolialexi, A., Tsangaris, G., and Mavrou, A. (2008) Development of cancer in patients with primary immunodeficiencies, *Anticancer Res.*, **28**, 1263-1269.
 31. Mortaz, E., Tabarsi, P., Mansouri, D., Khosravi, A., Garssen, J., Velayati, A., and Adcock, I. M. (2016) Cancers related to immunodeficiencies: update and perspectives, *Front. Immunol.*, **7**, 365, doi: 10.3389/fimmu.2016.00365.
 32. Bomken, S., van der Werff Ten Bosch, J., Attarbaschi, A., Bacon, C. M., Borkhardt, A., Boztug, K., Fischer, U., Hauck, F., Kuiper, R. P., Lammens, T., Loeffen, J., Neven, B., Pan-Hammarström, Q., Quinti, I., Seidel, M. G., Warnatz, K., Wehr, C., Lankester, A. C., and Gennery, A. R. (2018) Current Understanding and future research priorities in malignancy associated with inborn errors of immunity and DNA repair disorders: the perspective of an Interdisciplinary Working Group, *Front. Immunol.*, **9**, 2912, doi: 10.3389/fimmu.2018.02912.
 33. Abolhassani, H., Wang, Y., Hammarström, L., and Pan-Hammarström, Q. (2021) Hallmarks of cancers: primary antibody deficiency versus other inborn errors of immunity, *Front. Immunol.*, **12**, 720025, doi: 10.3389/FIMMU.2021.720025.
 34. Hauck, F., Voss, R., Urban, C., and Seidel, M. G. (2018) Intrinsic and extrinsic causes of malignancies in patients with primary immunodeficiency disorders, *J. Allergy Clin. Immunol.*, **141**, 59-68.e4, doi: 10.1016/j.jaci.2017.06.009.
 35. Kebudi, R., Kiykim, A., and Sahin, M. K. (2019) Primary immunodeficiency and cancer in children; a review of the literature, *Curr. Pediatr. Rev.*, **15**, 245-250, doi: 10.2174/1573396315666190917154058.
 36. Shapiro, R. S. (2011) Malignancies in the setting of primary immunodeficiency: implications for hematologists/oncologists, *Am. J. Hematol.*, **86**, 48-55, doi: 10.1002/AJH.21903.
 37. Worth, A. J. J., Houldcroft, C. J., and Booth, C. (2016) Severe Epstein-Barr virus infection in primary immunodeficiency and the normal host, *Br. J. Haematol.*, **175**, 559-576, doi: 10.1111/BJH.14339.
 38. Notarangelo, L. D., and Ochs, H. D. (2003) Wiskott-Aldrich Syndrome: A model for defective actin reorganization, cell trafficking and synapse formation, *Curr. Opin. Immunol.*, **15**, 585-591, doi: 10.1016/S0952-7915(03)00112-2.
 39. Fournier, B., Mahlaoui, N., Moshous, D., and de Villartay, J. P. (2022) Inborn errors of immunity caused by defects in the DNA damage response pathways: Importance of minimizing treatment-related genotoxicity, *Pediatr. Allergy Immunol.*, **33**, e13820, doi: 10.1111/PAI.13820.

40. Ratnaparkhe, M., Wong, J. K. L., Wei, P. C., Hlevnjak, M., Kolb, T., Simovic, M., Haag, D., Paul, Y., Devens, F., Northcott, P., Jones, D. T. W., Kool, M., Jauch, A., Pastorczak, A., Mlynarski, W., Korshunov, A., Kumar, R., Downing, S. M., Pfister, S. M., Zapatka, M., McKinnon, P. J., Alt, F. W., Lichter, P., and Ernst, A. (2018) Defective DNA damage repair leads to frequent catastrophic genomic events in murine and human tumors, *Nat. Commun.*, **9**, 4760, doi: 10.1038/S41467-018-06925-4.
41. de Miranda, N. F. C. C., Björkman, A., and Pan-Hammarström, Q. (2011) DNA repair: The link between primary immunodeficiency and cancer, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1246**, 50-63, doi: 10.1111/j.1749-6632.2011.06322.x.
42. Notarangelo, L. D., Kim, M. S., Walter, J. E., and Lee, Y. N. (2016) Human RAG mutations: biochemistry and clinical implications, *Nat. Rev. Immunol.*, **16**, 234, doi: 10.1038/NRI.2016.28.
43. Felgentreff, K., Lee, Y. N., Frugoni, F., Du, L., van der Burg, M., Giliani, S., Tezcan, I., Reisli, I., Mejstrikova, E., de Villartay, J. P., Sleckman, B. P., Manis, J., and Notarangelo, L. D. (2015) Functional analysis of naturally occurring DCLRE1C mutations and correlation with the clinical phenotype of ARTEMIS deficiency, *J. Allergy Clin. Immunol.*, **136**, 140-150.e7, doi: 10.1016/j.jaci.2015.03.005.
44. Woodbine, L., Gennery, A. R., and Jeggo, P. A. (2014) The clinical impact of deficiency in DNA non-homologous end-joining, *DNA Repair (Amst.)*, **16**, 84-96, doi: 10.1016/j.dnarep.2014.02.011.
45. Rothblum-Oviatt, C., Wright, J., Lefton-Greif, M. A., McGrath-Morrow, S. A., Crawford, T. O., and Lederman, H. M. (2016) Ataxia telangiectasia: a review, *Orphanet J. Rare Dis.*, **11**, 159, doi: 10.1186/s13023-016-0543-7.
46. Shiloh, Y., and Ziv, Y. (2013) The ATM protein kinase: regulating the cellular response to genotoxic stress, and more, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **14**, 197-210, doi: 10.1038/nrm3546.
47. Sandoval, C., and Swift, M. (2003) Hodgkin disease in ataxia-telangiectasia patients with poor outcomes, *Med. Pediatr. Oncol.*, **40**, 162-166, doi: 10.1002/mpo.10251.
48. Suarez, F., Mahlaoui, N., Canioni, D., Andriamanga, C., Dubois d'Enghien, C., Brousse, N., Jais, J. P., Fischer, A., Hermine, O., and Stoppa-Lyonnet, D. (2015) Incidence, presentation, and prognosis of malignancies in ataxia-telangiectasia: a report from the French national registry of primary immune deficiencies, *J. Clin. Oncol.*, **33**, 202-208, doi: 10.1200/JCO.2014.56.5101.
49. Tikoo, S., and Sengupta, S. (2010) Time to bloom, *Genome Integr.*, **1**, 14, doi: 10.1186/2041-9414-1-14.
50. Wu, L., and Hickson, I. O. (2003) The Bloom's syndrome helicase suppresses crossing over during homologous recombination, *Nature*, **426**, 870-874, doi: 10.1038/nature02253.
51. Ralf, C., Hickson, I. D., and Wu, L. (2006) The Bloom's syndrome helicase can promote the regression of a model replication fork, *J. Biol. Chem.*, **281**, 22839-22846, doi: 10.1074/jbc.M604268200.
52. Bohr, V. A. (2008) Rising from the RecQ-age: the role of human RecQ helicases in genome maintenance, *Trends Biochem. Sci.*, **33**, 609-620, doi: 10.1016/j.tibs.2008.09.003.
53. Sokolenko, A. P., Iyevleva, A. G., Preobrazhenskaya, E. V., Mitiushkina, N. V., Abysheva, S. N., Suspitsin, E. N., Kuligina, E. Sh., Gorodnova, T. V., Pfeifer, W., Togo, A. V., Turkevich, E. A., Ivantsov, A. O., Voskresenskiy, D. V., Dolmatov, G. D., Bit-Sava, E. M., Matsko, D. E., Semiglazov, V. F., Fichtner, I., Larionov, A. A., Kuznetsov, S. G., Antoniou, A. C., and Imyaninov, E. N. (2011) High prevalence and breast cancer predisposing role of the BLM c.1642 C>T (Q548X) mutation in Russia, *Int. J. Cancer*, **130**, 2867-2873, doi: 10.1002/ijc.26342.
54. Suspitsin, E. N., Yanus, G. A., Sokolenko, A. P., Yatsuk, O. S., Zaitseva, O. A., Bessonov, A. A., Ivantsov, A. O., Heinsteins, V. A., Klimashevskiy, V. F., Togo, A. V., and Imyaninov, E. N. (2014) Development of breast tumors in CHEK2, NBN/NBS1 and BLM mutation carriers does not commonly involve somatic inactivation of the wild-type allele, *Med. Oncol.*, **31**, 828, doi: 10.1007/s12032-013-0828-9.
55. Wolska-Kuśnierz, B., Gregorek, H., Chrzanowska, K., Piątosza, B., Pietrucha, B., Heropolitańska-Pliszka, E., Pac, M., Klaudel-Dreszler, M., Kostyuchenko, L., Pasic, S., Marodi, L., Belohradsky, B. H., Čížnár, P., Shcherbina, A., Kilic, S. S., Baumann, U., Seidel, M. G., Gennery, A. R., Syczewska, M., Mikołuc, B., Kałwak, K., Styczyński, J., Pieczonka, A., Drabko, K., Wakulińska, A., Gathmann, B., Albert, M. H., Skarżyńska, U., Bernatowska, E., and Inborn Errors Working Party of the Society for European Blood and Marrow Transplantation and the European Society for Immune Deficiencies (2015) Nijmegen Breakage Syndrome: clinical and immunological features, long-term outcome and treatment options – a retrospective analysis, *J. Clin. Immunol.*, **35**, 538-549, doi: 10.1007/s10875-015-0186-9.
56. Syed, A., and Tainer, J. A. (2018) The MRE11-RAD50-NBS1 complex conducts the orchestration of damage signaling and outcomes to stress in DNA replication and repair, *Annu. Rev. Biochem.*, **87**, 263, doi: 10.1146/ANNUREV-BIOCHEM-062917-012415.
57. Seemanova, E., Varon, R., Vejvalka, J., Jarolim, P., Seeman, P., Chrzanowska, K. H., Digweed, M., Resnick, I., Kremensky, I., Saar, K., Hoffmann, K., Dutranoy, V., Karbasiyan, M., Ghani, M., Barić, I., Tekin, M., Kovacs, P., Krawczak, M., Reis, A., Sperling, K., and Nothnagel, M. (2016) The Slavic NBN founder mutation: a role for reproductive fitness? *PLoS One*, **11**, e0167984, doi: 10.1371/journal.pone.0167984.

58. Sharapova, S. O., Pashchenko, O. E., Bondarenko, A. V., Vakhlyarskaya, S. S., Prokofjeva, T., Fedorova, A. S., Savchak, I., Mareika, Y., Valiev, T. T., Popa, A., Tuzankina, I. A., Vlasova, E. V., Sakovich, I. S., Polyakova, E. A., Rumiantseva, N. V., Naumchik, I. V., Kulyova, S. A., Aleshkevich, S. N., Golovataya, E. I., Minakovskaya, N. V., Belevtsev, M. V., Latysheva, E. A., Latysheva T. V., Beznoshchenko, A. G., Akopyan, H., Makukh, H., Kozlova, O., Varabyou, D. S., Ballow, M., Ong, M. S., Walter, J. E., Kondratenko, I. V., Kostyuchenko, L. V., and Aleinikova, O. V. (2021) Geographical distribution, incidence, malignancies, and outcome of 136 Eastern Slavic patients with Nijmegen Breakage Syndrome and NBN founder variant c.657_661del5, *Front. Immunol.*, **11**, 602482, doi: 10.3389/FIMMU.2020.602482.
59. Buslov, K. G., Iyevleva, A. G., Chekmariova, E. V., Suspitsin, E. N., Togo, A. V., Kuligina, E. Sh., Sokolenko, A. P., Matsko, D. E., Turkevich, E. A., Lazareva, Y. R., Chagunava, O. L., Bit-Sava, E. M., Semiglazov, V. F., Devilee, P., Cornelisse, C., Hanson, K. P., and Imyanitov, E. N. (2005) NBS1 657del5 mutation may contribute only to a limited fraction of breast cancer cases in Russia, *Int. J. Cancer*, **114**, 585-589, doi: 10.1002/ijc.20765.
60. Auerbach, A. D. (2009) Fanconi anemia and its diagnosis, *Mutat. Res.*, **668**, 4-10, doi: 10.1016/j.mrfmmm.2009.01.013.
61. Badra Fajardo, N., Taraviras, S., and Lygerou, Z. (2022) Fanconi anemia proteins and genome fragility: unraveling replication defects for cancer therapy, *Trends Cancer*, **8**, 467-481, doi: 10.1016/J.TRECAN.2022.01.015.
62. Prokofyeva, D., Bogdanova, N., Dubrowinskaja, N., Bermisheva, M., Takhirova, Z., Antonenkova, N., Turmanov, N., Datsyuk, I., Gantsev, S., Christiansen, H., Park-Simon, T. W., Hillemanns, P., Khusnutdinova, E., and Dörk, T. (2012) Nonsense mutation p.Q548X in BLM, the gene mutated in Bloom's syndrome, is associated with breast cancer in Slavic populations, *Breast Cancer Res. Treat.*, **137**, 533-539, doi: 10.1007/s10549-012-2357-1.
63. Tavtigian, S. V., Oefner, P. J., Babikyan, D., Hartmann, A., Healey, S., Le Calvez-Kelm, F., Lesueur, F., Byrnes, G. B., Chuang, S. C., Forey, N., Feuchtinger, C., Gioia, L., Hall, J., Hashibe, M., Herte, B., McKay-Chopin, S., Thomas, A., Vallée, M. P., Voegelé, C., Webb, P. M., Whiteman, D. C., Australian Cancer Study, Breast Cancer Family Registries (BCFR), Kathleen Cuninghame Foundation Consortium for Research into Familial Aspects of Breast Cancer (kConFab), Sangrajrang, S., Hopper, J. L., Southey, M. C., Andrulis, I. L., John, E. M., and Chenevix-Trench, G. (2009) Rare, evolutionarily unlikely missense substitutions in ATM confer increased risk of breast cancer, *Am. J. Hum. Genet.*, **85**, 427-446, doi: 10.1016/j.ajhg.2009.08.018.
64. Van Os, N. J. H., Roeleveld, N., Weemaes, C. M. R., Jongmans, M. C., Janssens, G. O., Taylor, A. M., Hoogerbrugge, N., and Willemssen, M. A. (2016) Health risks for ataxia-telangiectasia mutated heterozygotes: a systematic review, meta-analysis and evidence-based guideline, *Clin. Genet.*, **90**, 105-117, doi: 10.1111/cge.12710.
65. Seemanová, E., Jarolim, P., Seeman, P., Varon, R., Digweed, M., Swift, M., and Sperling, K. (2007) Cancer risk of heterozygotes with the NBN founder mutation, *J. Natl. Cancer Inst.*, **99**, 1875-1880, doi: 10.1093/jnci/djm251.
66. Kratz, C. P., and Izraeli, S. (2017) Down syndrome, RASopathies, and other rare syndromes, *Semin. Hematol.*, **54**, 123-128, doi: 10.1053/J.SEMINHEMATOL.2017.04.008.
67. Liao, J., and Mehta, L. (2019) Molecular genetics of noonan syndrome and RASopathies, *Pediatr. Endocrinol. Rev.*, **16** (Suppl 2), 435-446, doi: 10.17458/per.vol16.2019.lm.molecularnoonan.
68. Riller, Q., and Rieux-Laucat, F. (2021) RASopathies: from germline mutations to somatic and multigenic diseases, *Biomed. J.*, **44**, 422, doi: 10.1016/J.BJ.2021.06.004.
69. Walker, J. A., and Upadhyaya, M. (2018) Emerging therapeutic targets for neurofibromatosis type 1, *Expert Opin. Ther. Targets*, **22**, 419-437, doi: 10.1080/14728222.2018.1465931.
70. Choufani, S., Shuman, C., and Weksberg, R. (2013) Molecular findings in Beckwith-Wiedemann syndrome, *Am. J. Med. Genet. C Semin. Med. Genet.*, **163C**, 131-140, doi: 10.1002/AJMG.C.31363.
71. Mussa, A., Molinatto, C., Baldassarre, G., Riberi, E., Russo, S., Larizza, L., Riccio, A., and Ferrero, G. B. (2016) Cancer risk in Beckwith-Wiedemann syndrome: a systematic review and meta-analysis outlining a novel (epi)genotype specific histotype targeted screening protocol, *J. Pediatr.*, **176**, 142-149.e1, doi: 10.1016/J.JPIDS.2016.05.038.
72. Scott, R. H., Stiller, C. A., Walker, L., and Rahman, N. (2006) Syndromes and constitutional chromosomal abnormalities associated with Wilms tumour, *J. Med. Genet.*, **43**, 705-715, doi: 10.1136/JMG.2006.041723.
73. Eggermann, T., Maher, E. R., Kratz, C. P., and Prawitt, D. (2022) Molecular basis of Beckwith-Wiedemann syndrome spectrum with associated tumors and consequences for clinical practice, *Cancers (Basel)*, **14**, 3083, doi: 10.3390/cancers14133083.
74. Pan, Z., Chen, C., Long, H., Lei, C., Tang, G., Li, L., Feng, J., and Chen, F. (2013) Overexpression of GPC3 inhibits hepatocellular carcinoma cell proliferation and invasion through induction of apoptosis, *Mol. Med. Rep.*, **7**, 969-974, doi: 10.3892/MMR.2013.1279.
75. DeBaun, M. R., Ess, J., and Saunders, S. (2001) Simpson Golabi Behmel syndrome: progress toward understanding the molecular basis for overgrowth,

- malformation, and cancer predisposition, *Mol. Genet. Metab.*, **72**, 279-286, doi: 10.1006/MGME.2001.3150.
76. Astuti, D., Morris, M. R., Cooper, W. N., Staals, R. H., Wake, N. C., Fews, G. A., Gill, H., Gentle, D., Shuib, S., Ricketts, C. J., Cole, T., van Essen, A. J., van Lingen, R. A., Neri, G., Opitz, J. M., Rump, P., Stolte-Dijkstra, I., Müller, F., Pruijn, G. J., Latif, F., and Maher, E. R. (2012) Germline mutations in DIS3L2 cause the Perlman syndrome of overgrowth and Wilms tumor susceptibility, *Nat. Genet.*, **44**, 277-284, doi: 10.1038/NG.1071.
 77. Morris, M. R., Astuti, D., and Maher, E. R. (2013) Perlman syndrome: overgrowth, Wilms tumor predisposition and DIS3L2, *Am. J. Med. Genet. C Semin. Med. Genet.*, **163C**, 106-113, doi: 10.1002/AJMG.C.31358.
 78. Switon, K., Kotulska, K., Janusz-Kaminska, A., Zmorzynska, J., and Jaworski, J. (2017) Molecular neurobiology of mTOR, *Neuroscience*, **341**, 112-153, doi: 10.1016/j.neuroscience.2016.11.017.
 79. Lam, H. C., Nijmeh, J., and Henske, E. P. (2017) New developments in the genetics and pathogenesis of tumours in tuberous sclerosis complex, *J. Pathol.*, **241**, 219-225, doi: 10.1002/path.4827.
 80. Martin, K., Zhou, W., Bowman, M., Shih, J., Au, K. S., Dittenhafer-Reed, K. E., Sisson, K. A., Koeman, J., Weisenberger, D. J., Cottingham, S. L., DeRoos, S. T., Devinsky, O., Winn, M. E., Cherniack, A. D., Shen, H., Northrup, H., Krueger, D. A., and MacKeigan, J. P. (2017) The genomic landscape of tuberous sclerosis complex, *Nat. Commun.*, **8**, 15816, doi: 10.1038/ncomms15816.
 81. Xiao, G. H., Chernoff, J., and Testa, J. R. (2003) NF2: the wizardry of merlin, *Genes Chromosomes Cancer*, **38**, 389-399, doi: 10.1002/GCC.10282.
 82. Bachir, S., Shah, S., Shapiro, S., Koehler, A., Mahammedi, A., Samy, R. N., Zuccarello, M., Schorry, E., and Sengupta, S. (2021) Neurofibromatosis type 2 (NF2) and the implications for vestibular schwannoma and meningioma pathogenesis, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 1-12, doi: 10.3390/IJMS22020690.
 83. Sherborne, A. L., Lavergne, V., Yu, K., Lee, L., Davidson, P. R., Mazor, T., Smirnoff, I. V., Horvai, A. E., Loh, M., DuBois, S. G., Goldsby, R. E., Neglia, J. P., Hammond, S., Robison, L. L., Wustrack, R., Costello, J. F., Nakamura, A. O., Shannon, K. M., Bhatia, S., and Nakamura, J. L. (2017) Somatic and germline TP53 alterations in second malignant neoplasms from pediatric cancer survivors, *Clin. Cancer Res.*, **23**, 1852-1861, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-0610.
 84. Kleinerman, R. A., Yu, C. L., Little, M. P., Li, Y., Abramson, D., Seddon, J., and Tucker, M. A. (2012) Variation of second cancer risk by family history of retinoblastoma among long-term survivors, *J. Clin. Oncol.*, **30**, 950-957, doi: 10.1200/JCO.2011.37.0239.
 85. Sharif, S., Ferner, R., Birch, J. M., Gillespie, J. E., Gattamaneni, H. R., Baser, M. E., and Evans, D. G. (2006) Second primary tumors in neurofibromatosis 1 patients treated for optic glioma: substantial risks after radiotherapy, *J. Clin. Oncol.*, **24**, 2570-2575, doi: 10.1200/JCO.2005.03.8349.
 86. Pastorczak, A., Szczepanski, T., and Mlynarski, W. (2016) Clinical course and therapeutic implications for lymphoid malignancies in Nijmegen breakage syndrome, *Eur. J. Med. Genet.*, **59**, 126-132, doi: 10.1016/j.ejmg.2016.01.007.
 87. Slack, J., Albert, M. H., Balashov, D., Belohradsky, B. H., Bertaina, A., Blessing, J., Booth, C., Buechner, J., Buckley, R. H., Ouachée-Chardin, M., Deripapa, E., Drabko, K., Eapen, M., Feuchtinger, T., Finocchi, A., Gaspar, H. B., Ghosh, S., Gillio, A., Gonzalez-Granado, L. I., Grunebaum, E., Güngör, T., Heilmann, C., Helminen, M., Higuchi, K., Imai, K., Kalwak, K., Kanazawa, N., Karasu, G., Kucuk, Z. Y., Laberko, A., Lange, A., Mahlaoui, N., Meisel, R., Moshous, D., Muramatsu, H., Parikh, S., Pasic, S., Schmid, I., Schuetz, C., Schulz, A., Schultz, K. R., Shaw, P. J., Slatter, M. A., Sykora, K. W., Tamura, S., Taskinen, M., Wawer, A., Wolska-Kuśnier, B., Cowan, M. J., Fischer, A., Gennery, A. R., Inborn Errors Working Party of the European Society for Blood and Marrow Transplantation and the European Society for Immunodeficiencies; Stem Cell Transplant for Immunodeficiencies in Europe (SCETIDE), and Center for International Blood and Marrow Transplant Research, Primary Immunodeficiency Treatment Consortium (2018) Outcome of hematopoietic cell transplantation for DNA double-strand break repair disorders, *J. Allergy Clin. Immunol.*, **141**, 322-328.e10, doi: 10.1016/j.jaci.2017.02.036.
 88. Tran, H., Nourse, J., Hall, S., Green, M., Griffiths, L., and Gandhi, M. K. (2008) Immunodeficiency-associated lymphomas, *Blood Rev.*, **22**, 261-281, doi: 10.1016/j.blre.2008.03.009.
 89. Luo, C., Ye, W. R., Shi, W., Yin, P., Chen, C., He, Y. B., Chen, M. F., Zu, X. B., and Cai, Y. (2022) Perfect match: mTOR inhibitors and tuberous sclerosis complex, *Orphanet J. Rare Dis.*, **17**, 106, doi: 10.1186/S13023-022-02266-0.
 90. Lodi, M., Boccuto, L., Carai, A., Cacchione, A., and Miele, E. (2020) Low-grade gliomas in patients with Noonan syndrome: case-based review of the literature, *Diagnostics (Basel, Switzerland)*, **10**, 582, doi: 10.3390/DIAGNOSTICS10080582.
 91. Al-Sarhani, H., Gottumukkala, R. V., Grasparil, A. D. S. 2nd, Tung, E. L., Gee, M. S., and Greer, M. C. (2020) Screening of cancer predisposition syndromes, *Pediatr. Radiol.*, **52**, 401-417, doi: 10.1007/s00247-021-05023-w.
 92. Brodeur, G. M., Nichols, K. E., Plon, S. E., Schiffman, J. D., and Malkin, D. (2017) Pediatric cancer predisposition and surveillance: an overview, and a tribute to Alfred G. Knudson Jr, *Clin. Cancer Res.*, **23**, e1-e5, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-17-0702.

93. McNeil, E. D., Brown, M., Ching, A., and Debaun, M. R. (2001) Screening for Wilms tumor and hepatoblastoma in children with Beckwith–Wiedemann syndromes: a cost-effective model, *Med. Pediatr. Oncol.*, **37**, 349–356, doi: 10.1002/mpo.1209.
94. Villani, A., Shore, A., Wasserman, J. D., Stephens, D., Kim, R. H., Druker, H., Gallinger, B., Naumer, A., Kohlmann, W., Novokmet, A., Tabori, U., Tijerin, M., Greer, M. L., Finlay, J. L., Schiffman, J. D., and Malkin, D. (2016) Biochemical and imaging surveillance in germline TP53 mutation carriers with Li-Fraumeni syndrome: 11-year follow-up of a prospective observational study, *Lancet Oncol.*, **17**, 1295–1305, doi: 10.1016/S1470-2045(16)30249-2.

HEREDITARY CONDITIONS ASSOCIATED WITH ELEVATED CANCER RISK IN CHILDHOOD

Review

E. N. Suspitsin^{1,2*} and E. N. Imyanitov^{1,2}

¹ N. N. Petrov Institute of Oncology, 197758 St.-Petersburg, Russia; e-mail: evgeny.suspitsin@gmail.com

² Saint-Petersburg State Pediatric Medical University, 194100 St.-Petersburg, Russia

The widespread use of next-generation sequencing (NGS) technologies revealed that a significant percentage of tumors in children develop as a part of monogenic hereditary diseases. Predisposition to the development of pediatric neoplasms is characteristic of a wide range of conditions including hereditary tumor syndromes, primary immunodeficiencies, rasopathies, and phakomatosis. The mechanisms of tumor molecular pathogenesis are diverse and include disturbances in signaling cascades, defects in DNA repair, chromatin remodeling, and microRNA processing. Timely diagnosis of tumor-associated syndromes is important for the proper choice of cancer treatment, genetic counseling of families, and the development of surveillance programs. The review describes the spectrum of neoplasms characteristic of the most common syndromes and the molecular pathogenesis of these diseases.

Keywords: childhood tumors, mutation, rasopathy, phakomatosis, primary immunodeficiency

МЕХАНИЗМЫ РАЗВИТИЯ ВТОРИЧНЫХ ЛЕЙКОЗОВ, ВЫЗВАННЫХ ТЕРАПИЕЙ С ПРИМЕНЕНИЕМ ИНГИБИТОРОВ ТОПОИЗОМЕРАЗ

Обзор

© 2023 Н.А. Ломов^{1*}, В.С. Вьюшков¹, М.А. Рубцов^{1,2}

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, кафедра молекулярной биологии, 119234 Москва, Россия; электронная почта: lomov@mail.bio.msu.ru

² Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), Центр индустриальных технологий и предпринимательства, 119435 Москва, Россия

Поступила в редакцию 06.02.2023

После доработки 14.04.2023

Принята к публикации 20.04.2023

Лейкозы — опухолевые заболевания кроветворной ткани. Среди лейкозов выделяют отдельную группу заболеваний, развитие которых связано с предшествующей химиотерапией — вторичные лейкозы. Терапия рака ингибиторами ДНК-топоизомераз типа II является одной из самых эффективных среди химиотерапий. Однако ее побочным эффектом может стать развитие вторичного лейкоза, характеризующегося хромосомными перестройками с участием генов *AML1* или *MLL*. Характерный набор рекуррентных перестроек при таком лейкозе отличается от спектра хромосомных перестроек при других неоплазиях. В обзоре рассматриваются факторы, которые влияют на образование перестроек при обработке клеток ингибиторами ДНК-топоизомераз. К таким факторам в первую очередь относятся подвижность концов разрывов, образование которых предшествует транслокации, и появление новых функций у белков, которые образуются в клетке в результате транслокации.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: лейкозы, транслокации, слитые белки, ингибиторы топоизомераз.

DOI: 10.31857/S0320972523070047, **EDN:** FVBNLW

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы благодаря совершенствованию химиотерапевтических подходов продолжительность жизни пациентов с онкологическими заболеваниями заметно возросла. В то же время увеличение продолжительности жизни выявляет отдаленные побочные эффекты химиотерапии. К числу таких последствий относится так называемый вторичный, или обусловленный терапией, лейкоз. Одной из частых причин развития вторичного лейкоза является применение для терапии первичных опухолей препаратов из класса ингибиторов ДНК-топоизомераз типа II.

Цитогенетической особенностью опухолевых клеток пациентов со вторичным лейко-

зом являются хромосомные транслокации с участием гена, ассоциированного с острым миелоидным лейкозом (Acute myeloid leukemia, *AML1*), и гена, ассоциированного с лейкозом смешанного фенотипа (Mixed lineage leukemia, *MLL*). Эти гены необходимы для нормального развития клеток крови, поэтому нарушение их функции вследствие транслокации приводит к опухолевой трансформации кроветворных клеток. Считается, что хромосомные перестройки возникают из-за ошибочной репарации двуцепочечных разрывов, вносимых ДНК-топоизомеразой II после ее ингибирования. В этом обзоре мы рассмотрим молекулярные механизмы развития вторичных лейкозов, вызванных терапией ингибиторами ДНК-топоизомераз типа II.

Принятые сокращения: ДЦР — двуцепочечный разрыв ДНК; *AML1* (или *RUNX1*) — ген, ассоциированный с острым миелоидным лейкозом; *ETO* (или *RUNX1T1*) — ген, часто перестраивающийся с образованием транслокации t(8;21); *MLL* (или *KMT2A*) — ген, ассоциированный с лейкозом смешанного фенотипа; NHEJ — репарация ДЦР по механизму неомологичного соединения концов.

* Адресат для корреспонденции.

ОСТРЫЕ МИЕЛОИДНЫЕ ЛЕЙКОЗЫ, ВЫЗВАННЫЕ ТЕРАПИЕЙ

Лейкозы и хромосомные транслокации. Лейкозы, или лейкемии, — опухолевые заболевания кроветворной ткани, которые развиваются, когда недифференцированные (бластные) клетки теряют способность к образованию зрелых форм и накапливаются в костном мозге и в крови. Считается, что лейкозы возникают в результате трансформации лишь одной исходной клетки — стволовой лейкозной клетки [1]. В результате ее деления получается неопластический клон бластных клеток, который вытесняет нормальные элементы кроветворения из костного мозга и приводит к недостатку зрелых клеток в периферической крови, а инфильтрация лейкозными клетками внутренних органов нарушает их работу. Кроме лейкозов, к злокачественным заболеваниям кроветворной системы также относятся лимфомы. При лимфомах опухолевые клетки поражают лимфатическую систему — в первую очередь лимфатические узлы.

Считается, что к онкогенной трансформации клеток крови и костного мозга приводят определенные хромосомные транслокации — обмен участками между разными хромосомами. Когда в месте контакта двух фрагментов разных хромосом соединяются фрагменты разных генов — эти гены называют генами-партнерами по транслокации — образуются слитые гены, продукты которых называют слитыми (химерными) белками [2]. Хромосомная перестройка сама по себе может быть достаточным событием для развития лейкоза. В пользу этого говорят данные высокопроизводительного секвенирования: лейкозы несут очень мало соматических мутаций по сравнению с другими видами злокачественных новообразований [3, 4]. Тип хромосомной перестройки в лейкозных клетках, в частности то, какие гены являются партнерами по транслокации, влияет на развитие заболевания, прогноз и выбор лечения [5–7]. Определение того, какая именно хромосомная транслокация ассоциирована с данным лейкозом, является первостепенной задачей при постановке диагноза у пациентов [8].

Причины развития лейкозов после терапии опухолей. Хромосомные транслокации возникают при ошибках репарации двуцепочечных разрывов ДНК (ДЦР), когда концы разных разрывов сшиваются вместе. Поэтому причиной хромосомных транслокаций могут быть любые процессы, приводящие к образованию разрывов в ДНК. Среди естественных причин возникновения большого количества ДЦР в

клетке — активность ферментов во время таких процессов, как V(D)J-рекомбинация, переключение класса антител (CSR) и соматический гипермутагенез (SHM) при созревании лимфоцитов. С активностью этих ферментов связывают развитие многих лимфом, например, лимфомы Беркитта, которая сопровождается транслокацией t(8;14) между локусом *IGH* и геном *MYC* [9–11].

Другой причиной образования ДЦР в клетках может быть действие цитотоксических агентов или ионизирующего излучения, что происходит при радио- и химиотерапии опухолей и аутоиммунных заболеваниях. Накопление ДЦР в раковых клетках приводит к остановке деления и развитию в них апоптоза [12]. Однако побочным эффектом терапии является развитие вторичных опухолей. Таким образом, с появлением различных видов терапии опухолей возник и особый класс заболеваний — обусловленные терапией миелоидные неоплазии (therapy-related myeloid neoplasms, t-MN, или myeloid neoplasms post cytotoxic therapy, MN-pCT), также называемые вторичными неоплазиями.

Обусловленные терапией миелоидные неоплазии составляют 10–20% от всех случаев миелоидных лейкозов. Они развиваются в 0,8–6,3% случаев в течение 20 лет после предшествующей терапии с медианным временем 3–5 лет [13]. Выживаемость при таких вторичных заболеваниях измеряется месяцами, а не годами, что делает их одними из самых агрессивных видов рака — они считаются даже более опасными, чем аналогичные лейкозы, возникающие *de novo* [14–18].

Вторичные неоплазии можно разделить на группы в зависимости от терапии, которая им предшествовала — терапия алкилирующими агентами, радиотерапия или терапия ингибиторами ДНК-топоизомеразы II [19]. Обусловленные алкилирующими агентами и/или радиотерапией вторичные лейкозы обычно возникают через 4–7 лет после терапии и чаще всего относятся к хроническому лейкозу, тогда как обусловленные ингибиторами ДНК-топоизомеразы II вторичные лейкозы развиваются через 1–3 года и относятся к острому миелоидному лейкозу (topoisomerase inhibitor-related AML, TI-related AML). Реже вторичные неоплазии встречаются после терапии антиметаболитами, например метотрексатом [20]. Примечательно, что обусловленные разной терапией неоплазии характеризуются разными хромосомными абберациями. Так, для первой группы характерны крупные делеции участков 5 и 7 хромосом, тогда как для вторичных

неоплазий, вызванных терапией ингибиторами топоизомераз II, — сбалансированные (реципрокные) транслокации с участием хромосом 11 или 21 [13, 21–24]. Терапия ингибиторами ДНК-топоизомераз II выделяется в отдельную группу ввиду своего широкого распространения и вследствие своей эффективности.

ТОПОИЗОМЕРАЗНЫЕ ЯДЫ КАК ЭФФЕКТИВНОЕ СРЕДСТВО ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ТЕРАПИИ

В целом, противоопухолевая химиотерапия стала конвенциональным методом лечения только во второй половине XX века, до этого момента опухоли лечили хирургически или с помощью радиотерапии. Экстракт из тканей Подофилла щитовидного (*Podophyllum peltatum*), или подофиллин, эпизодически применялся в медицине против кожных опухолей и бородавок еще в XIX веке [25]. В 1946 г. было показано, что подофиллин препятствует делению клеток [26]. Однако попытки применения этого экстракта против опухолей были ограничены его высокой токсичностью [27]. Поэтому в 1950-х гг. начались поиски действующей молекулы из экстракта *Podophyllum*. Наилучшее противоопухолевое действие показал бензил-иден 4'-деметилэпиподофиллин глюкозид, и в 1966 г. был синтезирован его синтетический аналог — этопозид (VP-16), годом позже — тенипозид (VM-26). В 1974 г. завершились доклинические испытания, доказавшие их высокую эффективность против самых разных видов опухолей, а с 1983 г. было получено разрешение FDA (Food and Drug Administration) США на применение этопозидов в клинической практике [25]. На сегодня этопозид и аналогичные по механизму работы вещества находятся на переднем крае терапии самых разных типов опухолей: лейкозов, лимфом, сарком, рака молочной железы, рака легких и других [28, 29].

Интересно, что механизм действия этопозидов и тенипозидов на момент их одобрения еще не был установлен. Было показано, что этопозид приводит к фрагментации ДНК *in vivo*, однако он не способен вносить разрывы в очищенную ДНК [30]. Только в 1984 г. выяснили, что мишенью этопозидов являются топоизомеразы типа II — ферменты, особенно востребованные в делящихся клетках, к которым относятся клетки опухолей. Работа ДНК-топоизомераз типа II, с одной стороны, крайне необходима при делении, с другой — включает в себе смертельную опасность для клетки, так

как в процессе каталитического цикла топоизомеразы II вносит двуцепочечный разрыв в ДНК. Ниже пойдет речь о роли топоизомераз в клетке и механизме работы ДНК-топоизомераз типа II.

Топоизомеразы и их активность в клетках. К ДНК, представляющей собой двойную спираль, применимы законы топологии. Важной проблемой, связанной с топологией ДНК, является расхождение хромосом после репликации по дочерним клеткам. Так как репликация идет полуконсервативно — к каждой цепочке ДНК достраивается комплементарная ей цепь — то получившиеся хромосомы оказываются закручены относительно друг друга так же, как были закручены цепочки исходной двойной спирали ДНК. Эта ключевая проблема полуконсервативной модели репликации была сформулирована еще Фрэнсисом Криком и Джеймсоном Уотсоном, а также Максом Дельбрюком, который для ее разрешения даже предложил альтернативную модель репликации — дисперсную модель [31, 32].

Проблемы, связанные с топологией ДНК, решаются ферментами-топоизомеразами с помощью временного разрыва цепочки ДНК. Топоизомеразы типа I вносят одноцепочечный разрыв, позволяя одной цепочке вращаться вокруг второй, тогда как топоизомеразы типа II вносят двуцепочечный разрыв, через который может пройти другой фрагмент ДНК [33, 34]. Для разделения переплетенных хромосом может использоваться только ДНК-топоизомераза типа II, что было показано для многих организмов [35–38]. Поэтому любым делящимся клеткам критически необходима работа топоизомераз именно типа II.

Задача ДНК-топоизомераз типа II заключается в контролируемом внесении двуцепочечных разрывов в ДНК, которые необходимы для расплетения хромосом. Почти все ДНК-топоизомеразы типа II из разных организмов гомологичны друг другу (их относят к подтипу IIa) и работают по одному механизму (рис. 1). ДНК-топоизомераза IIa представляет собой гомодимер, мономеры которого соединяются друг с другом тремя участками, формируя трое «ворот» — N-, ДНК- и C-ворота. Ворота последовательно открываются и закрываются, пропуская фрагмент ДНК, называемый Т-фрагментом (от «transport»). ДНК-ворота, расположенные в середине, вызывают другой фрагмент ДНК (G-фрагмент, от «gate») и открываются, временно разрывая его. Когда Т-фрагмент ДНК проходит ДНК-ворота и они закрываются, разрыв в G-фрагменте лигируется. Образование двуцепочечного

разрыва в G-фрагменте происходит за счет двух реакций переэтерификации: остатки тирозина каждой из субъединиц топоизомеразы атакуют фосфодиэфирные связи на разных цепях ДНК, образуя ковалентные связи с 5'-фосфатами нуклеотидов [39–41]. Когда T-фрагмент высвобождается через С-ворота, топоизомераза возвращается в исходное состояние и цикл ее работы завершается. Хотя сама реакция переэтерификации не требует затрат энергии, в ходе каталитического цикла топоизомеразы типа II гидролизует две молекулы АТР, которые аллостерически координируют открытие и закрытие ворот во время каталитического цикла топоизомеразы [42–44]. Согласованность в работе ворот крайне важна: если все ворота окажутся одновременно открытыми, это значит, что субъединицы топоизомеразы отсоединились друг от друга, и временный разрыв ДНК превратится в постоянный.

Топоизомеразные яды. На сегодняшний день изучены различные ингибиторы ДНК-топоизомераз типа II (топо2-ингибиторы). По механизму действия их принято делить на 2 группы — ингибиторы каталитического цикла и топоизомеразные яды (catalytic inhibitors и poisons соответственно). Первые действуют на любых стадиях каталитического цикла, включая связывание и гидролиз АТР, связывание и разрезание ДНК. Вторая группа — так называемые топоизомеразные яды, действие которых характеризуется повышением в клетке количества ковалентно связанных комплексов ДНК–фермент (Top2cc). Большинство используемых на сегодня в терапии опухолей топо2-ингибиторов относятся к группе топоизомеразных ядов [41, 45]. Чаще всего среди них используется этопозид, его механизм действия подробно изучен. Этопозид связывается с ковалентным комплексом топоизомеразы с ДНК и стабилизирует его, препятствуя религированию ДНК [46]. Когда в G-фрагмент ДНК внесен разрыв, молекула этопозид нековалентно связывается с ферментом, что препятствует полному закрытию ДНК-ворот и сближению концов разрыва ДНК (рис. 2).

Пути удаления топоизомеразы с ДНК. Остановленная ДНК-топоизомераза, ковалентно связанная с ДНК, препятствует нормальной транскрипции и репликации, что запускает процесс ее деградации [47]. В клетках человека существует несколько путей удаления топоизомеразы, ковалентно сшитой с ДНК. Их можно разделить на протеолитические и нуклеолитические пути. Протеолитические пути предполагают деградацию белка с помощью протеасомы или специальной протеазы SPRTN

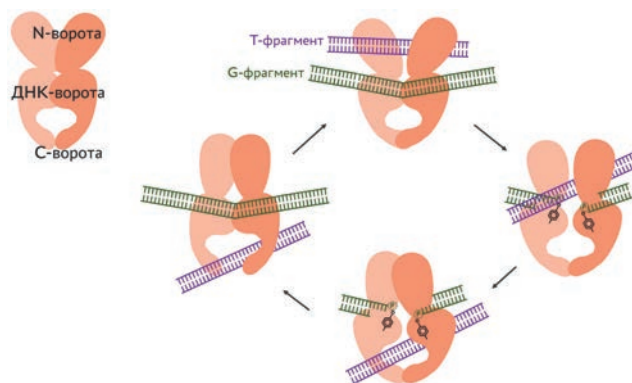


Рис. 1. Механизм работы топоизомеразы типа II. На схеме показано согласованное изменение конформации фермента, что приводит к последовательному перемещению T-фрагмента ДНК через G-фрагмент, при этом субъединицы фермента всегда удерживаются вместе. Для разрыва в G-фрагменте фермент формирует фосфодиэфирную связь с ДНК через остаток тирозина

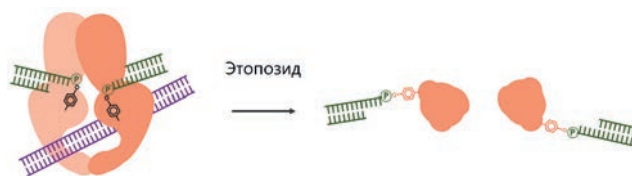


Рис. 2. Действие топоизомеразного яда (этопозид) на ДНК-топоизомеразу II, приводящее к образованию двуцепочечного разрыва ДНК с ковалентно связанной на конце ДНК субъединицей топоизомеразы — Top2cc по [48]

(Protein with SprT-like domain at the N terminus) с последующим отщеплением остатка полипептида ДНК-фосфодиэстеразой TDP2 (tyrosyl DNA phosphodiesterase 2). Нуклеолитический путь предполагает отщепление участка цепочки ДНК, на конце которого ковалентно пришит белок, с помощью эндонуклеаз систем репарации [48, 49].

В любом случае удаление топоизомеразы приводит к образованию в ДНК двуцепочечного разрыва. Множественные ДЦР приводят к запуску клеточного ответа на повреждение ДНК, что включает в себя фосфорилирование остатка S139 гистонов H2A.X, репарацию ДНК или индукцию апоптоза [50]. Действие этопозид можно зарегистрировать по появлению фосфорилированного гистона H2A.X (γ H2A.X) уже через несколько минут после обработки им клеток [51, 52]. Ряд экспериментов подтверждает ключевую роль ингибирования ДНК-топоизомеразы II в образовании транслокаций, вызванных соответствующей терапией. Так, этопозид индуцирует образование двуцепочечных разрывов в генах *AML1*, *MLL* и их партнеров, а к месту разрыва привлекаются белки репарации [52–56]. Эти разрывы локализуются в кластерах точек разрывов, обнаруженных у пациентов со вторичным лейкозом.

Рекуррентные транслокации, обнаруживаемые при лейкозах, вызванных терапией ингибиторами ДНК-топоизомераз II [57]

Ген	Транслокация	Ген-партнер	Ссылки
<i>AML1 (RUNX1)</i>	t(8;21)(q22;q22)	<i>ETO (RUNX1T1)</i>	[58–62]
	t(3;21)(q26.2;q22)	<i>MDS1-EVI1 (MECOM, PRDM3)</i>	[63, 64]
	t(1;21)(p36;q21)	<i>PRDM16</i>	[65, 66]
<i>MLL (KMT2A)</i>	t(9;11)(p22;q23)	<i>AF9 (MLLT3)</i>	[58, 60]
	t(4;11)(q21;q23)	<i>AF4 (AFF1, MLLT2)</i>	[67, 68]
	t(19;11)(q13;q23)	<i>ELL</i>	[60, 69]
	t(11;19)(q23;p13.3)	<i>ENL (MLLT1)</i>	[60, 69, 70]
	t(11;16)(q23;p13)	<i>CREBBP (CBP)</i>	[71–73]

Примечание. Указаны различные названия генов; полужирным шрифтом выделены те названия, которые приняты за официальные в современной классификации генов HUGO Gene Nomenclature Committee.

Транслокации, рекуррентные для вторичных острых миелоидных лейкозов (ОМЛ), вызванных терапией ингибиторами ДНК-топоизомеразы II. Вторичные лейкозы, вызванные терапией ингибиторами ДНК-топоизомеразы II, характеризуются транслокациями с участием генов *AML1* или *MLL*, лежащих на хромосомах 21 и 11. Причем список перестроек, которые раз за разом встречаются при этом типе лейкоза, включает лишь 8 транслокаций (таблица).

Представленный набор транслокаций отличается ограниченностью: для других опухолей характерен гораздо более широкий набор хромосомных aberrаций, в том числе более широкий набор транслокаций с участием генов *AML1* и *MLL*. В данном обзоре будут рассмотрены факторы, обуславливающие возникновение транслокаций в случае лейкозов, вызванных терапией ингибиторами ДНК-топоизомераз типа II.

ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА ОБРАЗОВАНИЕ ХРОМОСОМНЫХ ТРАНСЛОКАЦИЙ

Поиск универсальных механизмов образования транслокаций поначалу привел к выявлению двух основных факторов, определяющих результат перестройки. Первый фактор — взаимное расположение в ядре перестраивающихся генов до момента образования в них разрыва. Чем ближе расположены локусы друг к другу в ядре, тем выше вероятность перестройки между ними. Второй фактор — подвижность перестраивающихся генов в пространстве

ядра. Чем выше подвижность концов разрывов в ядре, тем меньше на выбор партнера по перестройке будет влиять изначальное расположение перестраивающихся локусов. С одной стороны, различными методами была показана прямая корреляция между частотой формирования транслокаций и пространственной близостью перестраивающихся локусов [74–77]. С другой стороны, многие исследования подтверждают повышенную подвижность двуцепочечных разрывов в ядре, например, их кластеризацию [78–80]. Кроме того, было показано, что вероятность образования конкретных транслокаций во многом зависит от вероятности возникновения разрывов в перестраивающихся локусах [75]. Скорее всего, разные факторы важны в разной степени в случае той или иной транслокации [57, 81]. Например, в работе по наблюдению за процессом образования транслокаций в живых клетках было показано, что и изначально близкие, и далекие локусы формировали транслокации после внесения в них разрывов, однако чаще происходили транслокации между близкими локусами [82].

Далее, рассмотрим факторы, которые являются определяющими для транслокаций при вторичных лейкозах, вызванных терапией топоизомеразными ядами. Во-первых, топоизомеразные яды вызывают разрывы в неслучайных участках генома, хотя таких участков и очень много. Работы по секвенированию точек разрывов, вызванных обработкой этопозидом, показывают, что к ним в большей степени чувствительны участки в основаниях хроматиновых петель [83, 84]. Также разрывы ДНК, индуцированные этопозидом, отличаются ходом

репарации от прочих ДЦР в клетке — необходимость процессинга концов разрывов приводит к задержке начала их репарации, что способствует пространственному разделению концов разрыва. Так, флуоресцентная *in situ* гибридизация (FISH-анализ) с применением двуцветной пробы на разрыв (break-apart FISH probe) показывает, что при обработке клеток этопозидом начало и конец многих аллелей *MLL* и *AML1* расходятся на расстояние, детектируемое с помощью светового микроскопа (несколько сотен нанометров). Такого расхождения концов *MLL* и *AML1* не наблюдается при обработке клеток высокими дозами радиации [57]. Обычно репарация двуцепочечных разрывов осуществляется по механизму негомولوجичного соединения концов (NHEJ). Этот механизм довольно надежен, и при репарации концы разрыва сначала быстро соединяются с помощью комплекса белков и удерживаются до момента лигирования ДНК [85–87]. В случае же индукции разрывов ДНК этопозидом необходимость в процессинге ковалентного комплекса топоизомеразы с ДНК приводит к задержке формирования комплекса белков NHEJ. Это существенно повышает шансы расхождения концов разрыва в пространстве ядра и соединения их с концами другого разрыва с образованием транслокации. Похожая ситуация наблюдается при индукции разрывов эктопически экспрессируемой в клетках нуклеазой Cas9 с одновременной обработкой клеток ингибиторами белков системы NHEJ — в этом случае число транслокаций также возрастает [88].

В ситуации, когда разрывы дольше остаются не сшитыми, их концы демонстрируют и большую подвижность в пространстве ядра. Так, *in vivo* наблюдение за фокусами белка 53BP1, который связывается с разрывами ДНК, показывает более высокую подвижность разрывов, индуцированных этопозидом, по сравнению с разрывами, вызванными радиацией [89]. К свидетельствам в пользу высокой подвижности разрывов можно отнести и то, что после обработки клеток этопозидом разрывы чаще локализуются вне хромосомных территорий, в которых они находятся в норме [57, 90]. В связи с повышенной подвижностью концов разрывов для транслокаций, происходящих после воздействия этопозидом, взаимное расположение генов-партнеров в ядре уже не имеет определяющего значения. Так, 4С-анализ контактов *AML1* и *MLL* не выявляет какого-либо предпочтения для их генов-партнеров по транслокациям по сравнению с другими генами [57].

В целом, развитие опухоли — процесс, похожий на дарвиновскую эволюцию: среди клеток с различными транслокациями отбираются те, в которых образуются новые функциональные гены, влияющие на пролиферативные свойства клетки [91]. Поэтому набор наблюдаемых у пациентов транслокаций будет включать только те транслокации, которые дают клеткам пролиферативное преимущество. Далее мы рассмотрим, почему транслокации, характерные для вызванных терапией топоизомеразными ядами вторичных лейкозов, приводят к раковому перерождению бластных клеток. Для этого рассмотрим строение и функции нормальных белков *AML1* и *MLL*, а также слитых с ними белков, которые образуются в результате транслокаций с участием *AML1* и *MLL*.

МЕХАНИЗМЫ ОНКОГЕННОСТИ ТРАНСЛОКАЦИЙ С УЧАСТИЕМ ГЕНОВ *AML1* И *MLL*

Ген *AML1*. В 1991 г. был идентифицирован точный локус хромосомной перестройки t(8;21) у пациентов с острым миелоидным лейкозом. Перестраиваемый ген был, соответственно, назван *AML1* [92]. Затем ученые выяснили, что ген *AML1* гомологичен гену дрозофилы *runt*, открытому еще в 1980-е гг., и поэтому *AML1* получил второе название *RUNX1*, от Runt-related transcription factor [63]. Вскоре было обнаружено, что этот ген часто перестраивается при лейкозах, вызванных терапией ингибиторами ДНК-топоизомераз II [93, 94]. В настоящее время известно, что ген *AML1* участвует в перестройках не только при ОМЛ, но и при некоторых других видах лейкозов [63, 95].

Изоформы мРНК и белка *AML1*. Выделяют три основные изоформы белка: *AML1A*, *AML1B* и *AML1C*. Все они содержат вблизи N-конца Runt-домен (runt-homology domain, RHD), необходимый для связывания с ДНК и для гетеродимеризации *AML1* с белком *CBFβ* (core binding factor β). Гетеродимеризация с *CBFβ* повышает сродство *AML1* к ДНК, хотя сам *CBFβ* не взаимодействует с ДНК [96, 97]. Более длинные изоформы В и С содержат трансактивирующий домен (transactivation domain, TAD) и консервативный участок *VWRPY* на С-конце белка, участвующий во взаимодействии с некоторыми белками-репрессорами (рис. 3).

Нормальная функция *AML1*. Ген *AML1* экспрессируется в кроветворных клетках на протяжении всего онтогенеза [98]. Изучение его функции началось с нокаута *Aml1* у мышей. В этих работах было показано, что основную

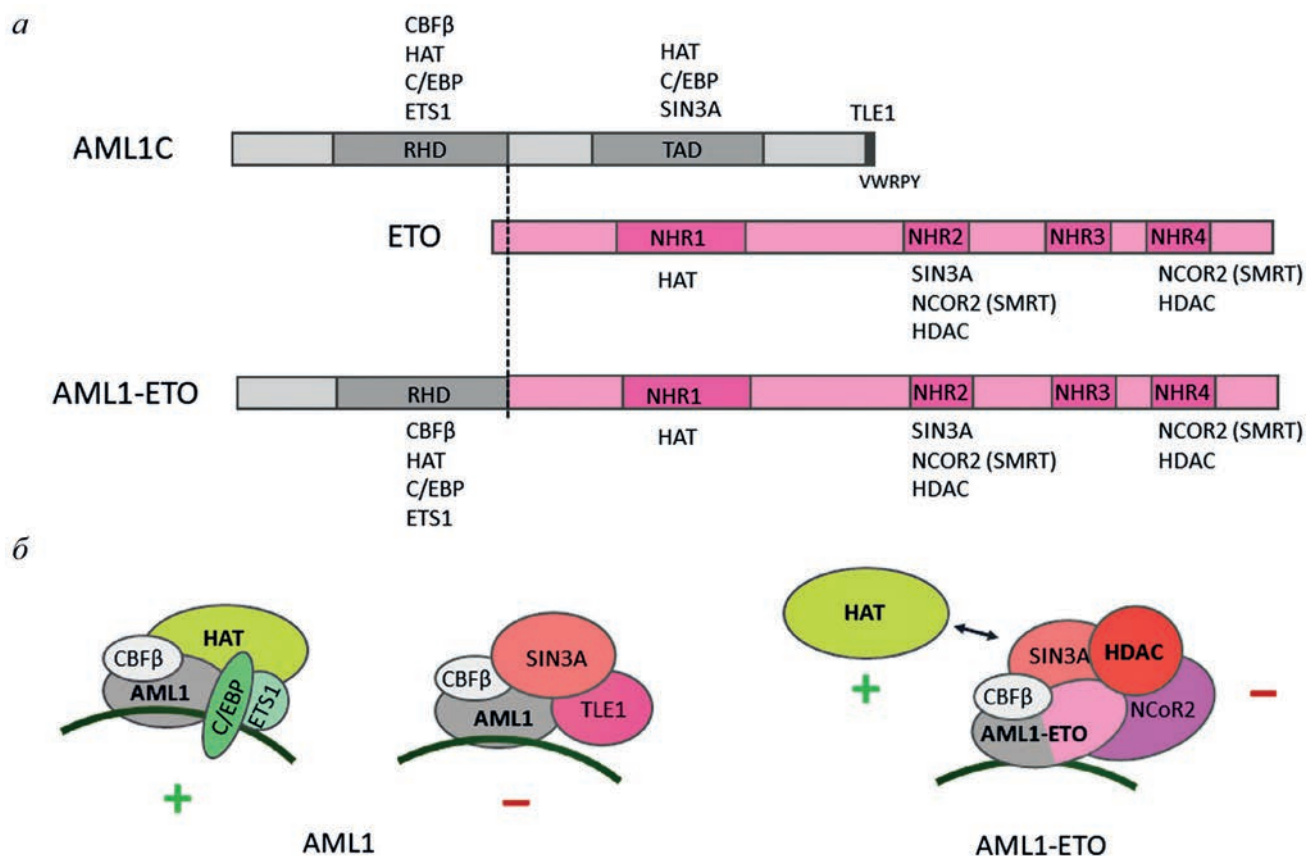


Рис. 3. Белки AML1, ETO и слитый белок AML1-ETO. *а* — Доменная структура AML1, ETO и слитого белка AML1-ETO. У AML1: RHD — runt-homology domain, TAD — трансактивирующий домен, на C-конце отмечен пептид VWRPY. У ETO: NHR1–3 — nervy homology regions, MYND — (myeloid, Nervy, and DEAF-1)-домен. Возле доменов перечислены белки, с которыми они взаимодействуют. *б* — Комплексы, формируемые на ДНК нормальным AML1 и слитым AML1-ETO. CBFB, C/EBP, ETS1, TLE1 и SIN3A — белки, взаимодействующие с AML1 или AML1-ETO. HAT — гистонацетилазы; HDAC — гистондеацетилазы

свою роль AML1 играет при созревании гемопоэтических стволовых клеток в раннем эмбриогенезе [99–103]. Дальнейшие опыты, проведенные *in vitro* на клетках гемогенного эндотелия мыши, продемонстрировали направляющую функцию AML1 в гемопоэзе: при дифференцировке этих клеток до гемопоэтических стволовых клеток AML1 связывается с промоторами множества генов, привлекая коактиваторы или корепрессоры. AML1 активирует гены, участвующие в дифференцировке миелоидных клеток и эритроцитов, а к группе репрессируемых им принадлежат гены, играющие роль в развитии нервной системы, скелетных мышц и печени [104]. Таким образом, AML1 является многофункциональным регулятором транскрипции генов, участвующих в дифференцировке гемопоэтических клеток. Для активации генов комплекс AML1/CBFB способен рекрутировать такие белки, как гистонацетилазы p300 и CREBBP (cyclic AMP response element binding protein), коактиватор транскрипции C/EBP (CCAAT-enhancer-binding protein), транскрипционные факторы

YAP (Yes[киназа] associated protein), GATA-1 (названный по узнаваемой им последовательности), ETS1 (Erythroblast Transformation Specific) и другие [105–113]. А в роли рекрутируемых AML1 репрессоров выступают транскрипционные факторы TLE1 (Transducin like enhancer of split 1) и SIN3A (гомолог SIN3 дрожжей) [114, 115]. Связывание различных белков зависит от фосфорилирования AML1 и отличается у разных изоформ [115–117].

Развитие лейкозов при перестройках гена AML1. Среди партнеров AML1 при рекуррентных транслокациях, вызванных ингибиторами топоизомераз, самый частый — ген ETO (Eight twenty one), также называемый RUNX1T1 [118]. Оба названия гена отсылают к его транслокации t(8;21) с AML1 (RUNX1). Эта хромосомная транслокация встречается также при других лейкозах и в достаточной мере изучена [119]. При транслокации AML1-ETO в получающемся слитом белке присутствует N-конец от белка AML1, содержащий домен RHD. C-Конец слитого белка представлен почти полноразмерным белком ETO (рис. 3) [97].

Белок ЕТО представляет собой транскрипционный репрессор, в структуре которого присутствуют четыре консервативных участка NHR (nervy homology regions – гомологичны по последовательности белку Nervy дрозофилы) [120]. ЕТО сам по себе не связывается с ДНК – к целевому локусу он привлекается через транскрипционные факторы. А репрессия осуществляется с помощью корепрессоров, взаимодействующих с NHR-участками: NCoR1 (nuclear receptor corepressor), SMRT (silencing mediator of retinoid and thyroid receptors), SIN3A и деацетилаз гистонов [121, 122].

Ген *ETO* в норме не экспрессируется в кроветворных и лимфоидных органах [123]. Можно заключить, что образование слитого гена *AML1–ETO* приводит, во-первых, к появлению практически полноразмерного белка ЕТО в клетках, где он не должен присутствовать; а во-вторых, ЕТО за счет участка *AML1* привлекается к генам, к которым он не должен привлекаться. В итоге репрессируется транскрипция многих генов, экспрессия которых в норме регулируется транскрипционным фактором *AML1* [124–126].

В реальности ситуация сложнее – экспрессия слитого белка приводит не только к репрессии многих генов, но и к активации некоторых других генов с помощью привлекаемых белков-активаторов. Так, было показано, что ЕТО способен привлекать гистонацетилаз трансферазы с помощью первого участка NHR [127]. Вероятно, репрессирующее или активирующее действие *AML1–ETO* зависит от сигнальных каскадов, активных в данный момент в клетке, и особенностей хроматина в том месте, где находится регулируемый ген [128, 129].

Важной особенностью клеток с *t(8;21)*, полученных от пациентов, является наличие интактного аллеля *AML1*, что говорит о необходимости нормального *AML1* для клетки [130]. По-видимому, интактный *AML1* и слитый *AML1–ETO* конкурируют за связывание с промоторами генов – нокдаун *AML1–ETO* в этих клетках меняет распределение сайтов связывания нормального *AML1* [131, 132].

Также стоит отметить, что для развития лейкоза, кроме перестройки *AML1–ETO*, необходимы дополнительные мутации, по крайней мере в мышиных моделях [98, 133, 134]. Существуют данные о том, что на развитие лейкоза влияет и то, какие изоформы белка получают в результате альтернативного сплайсинга слитой мРНК [129, 135, 136]. Можно заключить, что экспрессия слитого белка *AML1–ETO* – первый шаг, который создает условия

для дальнейших преобразований клетки на пути к развитию лейкоза.

Ген *MLL*. В 1980-х гг. среди пациентов с острым лейкозом начали выделять подгруппу с крайне неблагоприятным прогнозом. С появлением проточной цитофлуориметрии было обнаружено, что бластные клетки этих агрессивных лейкозов часто экспрессируют поверхностные маркеры, свойственные как лимфоидной, так и миелоидной линиям. Иногда во время лечения наблюдалась даже смена набора этих поверхностных маркеров, и лейкоз, первоначально диагностированный как острый лимфоидный, мог рецидивировать в острый миелоидный. Соответственно, был введен термин «лейкоз смешанного фенотипа» [137–139]. Вскоре стало ясно, что для этого лейкоза характерна транслокация локуса 11q23. В 1991 г. был идентифицирован ген, который находится в точке перестройки в клетках таких пациентов. Соответственно, ген был назван *MLL*, от mixed lineage leukemia (лейкоз смешанного фенотипа). Выявленный ген оказался гомологом гена *trithorax* дрозофилы, кодирующего лизинметилтрансферазу, которая активирует Нох-гены [140, 141]. Ген *MLL* кодирует лизинметилтрансферазу 2А, и отсюда его другое название – *KMT2A* (lysine (K)-specific methyltransferase 2A).

Хромосомные транслокации с участием гена *MLL* наблюдаются примерно в 10% случаев острого миелоидного и острого лимфоидного лейкозов [142], причем среди лейкозов, вызванных терапией топоизомеразными ядами, такие транслокации составляют большую часть [24, 143, 144]. Особенно часто – до 85% случаев – перестройки *MLL* встречаются при острых лейкозах у детей первого года жизни. Также мутации этого гена обнаруживаются и при многих других видах рака: в частности, рака толстой кишки, легких, мочевого пузыря, эндометрия и при раке груди [145–148].

Экспрессия перестроившегося *MLL*, слившегося с одним из своих многочисленных генов-партнеров, достаточна для запуска событий, приводящих к развитию лейкоза, что напрямую показано на мышах [142]. Это объясняется глобальной функцией *MLL* в клетках, где он экспрессируется: комплекс белков, формирующийся на основе *MLL*, осуществляет эпигенетическую маркировку промоторов тканеспецифичных генов. Такая маркировка необходима для поддержания паттерна экспрессии этих генов в процессе пролиферации и дифференциации клеток – другими словами, *MLL* отвечает за «транскрипционную память» клеток при их делении [149].

Ген *MLL* играет важную роль в эмбриональном развитии, особенно на ранних стадиях гемопоэза, хотя и во взрослом возрасте активно экспрессируется в некоторых тканях. Особая роль *MLL* в эмбриональном развитии состоит в активации транскрипции *HOX*-генов и некоторых других генов, связанных с пролиферацией и регуляцией клеточного цикла [150–154]. Нокаут по *Mll* приводит к гибели мышей на ранних стадиях эмбриогенеза из-за нарушений гемопоэза и дифференциации гемопоэтических стволовых клеток [155–157]. Кондиционный нокаут *Mll* у мышей показывает, что во взрослом организме экспрессия *Mll* необходима клеткам костного мозга [158].

Структура белка MLL. Структура нормального белка *MLL* позволяет понять механизмы его работы в клетке и последствия образования слитых с *MLL* белков. *MLL* – крупный многодоменный белок, состоящий из 3969 аминокислот, его молекулярная масса – 500 кДа (рис. 4). Несколько доменов *MLL* отвечают за взаимодействие с определенными участками хроматина, а также с белками, работающими в комплексе с *MLL* – это домены AT-hook, CxxC, PHD. Каталитический домен осуществляет ди- и триметилирование лизина, находящегося в положении 4 полипептидной цепи гистона H3 (H3K4me2/3), что сопряжено с активацией транскрипции соответствующих генов [145]. После синтеза на рибосоме *MLL* расщепляется протеазой таспазой 1 на два полипептида – N-*MLL* и C-*MLL*, которые образуют единый комплекс, взаимодействуя доменами FYRN и FYRC [159].

На N-фрагменте *MLL* находятся все домены, отвечающие за связывание транскрибируемой ДНК. AT-hook – участок неспецифического взаимодействия белка с малой бороздкой ДНК. Домен CxxC обеспечивает уже специфическое связывание *MLL* с неметилированными CpG-динуклеотидами, которые характерны для активных промоторов [160–162]. Окружающие CxxC-домен участки – pre-CxxC и post-CxxC – важны для взаимодействия *MLL* с элонгационными факторами РНК-полимеразы II PAFc (polymerase associated factor complex) [163]. Ближе к середине белка находится домен PHD (plant homeodomain), распознающий H3K4me2/3, – метку промоторов активных генов [164–166]. Также на N-фрагменте *MLL* находится мотив для связывания адаптерных белков Menin1 и PSIP1 (PC4 [positive coactivator 4] And SFRS1 [Serine And Arginine Rich Splicing Factor 1] Interacting Protein 1; другое название белка – LEDGF/p75), которые дополнительно обеспечива-

ют привлечение *MLL* к участкам хроматина с H3K36me2/3 [167, 168].

C-Концевой фрагмент *MLL* содержит домен TAD (transactivation domain), привлекающий гистонацетилтрансферазы H3K27, H3K9 и H4K16 – p300/CREBBP, MOZ (monocytic leukemic zinc-finger protein) и MOF (назван по гомологу из дрозофилы MOF) соответственно [169]. На C-конце *MLL* находится домен SET (Su(var)3-9, Enhancer-of-zeste and Trithorax), который катализирует ди- и триметилирование H3K4 [170]. Вдобавок C-*MLL* привлекает белки WDR5 (WD repeat-containing protein 5), RbBP5 (Retinoblastoma-binding protein 5), ASH2L (Absent, small, or homeotic discs protein 2 like) и DPY30, и в составе полученного комплекса метилирующая активность SET-домена *MLL* многократно усиливается [145, 171–173].

Важным свойством *MLL*-комплекса является возможность его переключения между состояниями транскрипционного активатора и транскрипционного репрессора. Переключение происходит за счет белка CYP33 (cyclophilin 33) – пролин-изомеразы, при связывании с которой происходит *цис/транс*-изомеризация пролина в составе PHD [174]. В результате *MLL* меняет свою структуру так, что вместо узнавания H3K4me2/3 домен PHD начинает связывать деацетилазы гистонов, репрессирующие транскрипцию [175–177]. Важность этого механизма подчеркивается тем, что удаление из *MLL* участка PHD приводит к опухолевой трансформации клетки [178, 179].

Таким образом, белок *MLL* является регулятором транскрипции генов, которые несут метки активного хроматина – определенные гистоновые модификации и неметилированные CpG. В зависимости от контекста и активных сигнальных путей *MLL* записывает активирующие модификации с помощью SET-домена и привлекаемых гистоновых ацетилтрансфераз либо репрессирующие – за счет привлекаемых гистоновых деацетилаз [149]. Можно заключить, что *MLL* обеспечивает транскрипционную память при линейной дифференцировке клеток в ходе эмбрионального развития и в гемопоэзе.

Развитие лейкозов при перестройках гена MLL. Хромосомные транслокации гена *MLL* чаще всего происходят с разрывом этого гена в так называемом кластере точек разрыва, BCR (breakpoint cluster region), протяженностью около 10 т.п.н. Этот BCR захватывает интроны с 9 по 11. В структуре белка это соответствует области домена PHD. В слитых белках присутствует N-концевая часть белка *MLL*, а C-конец

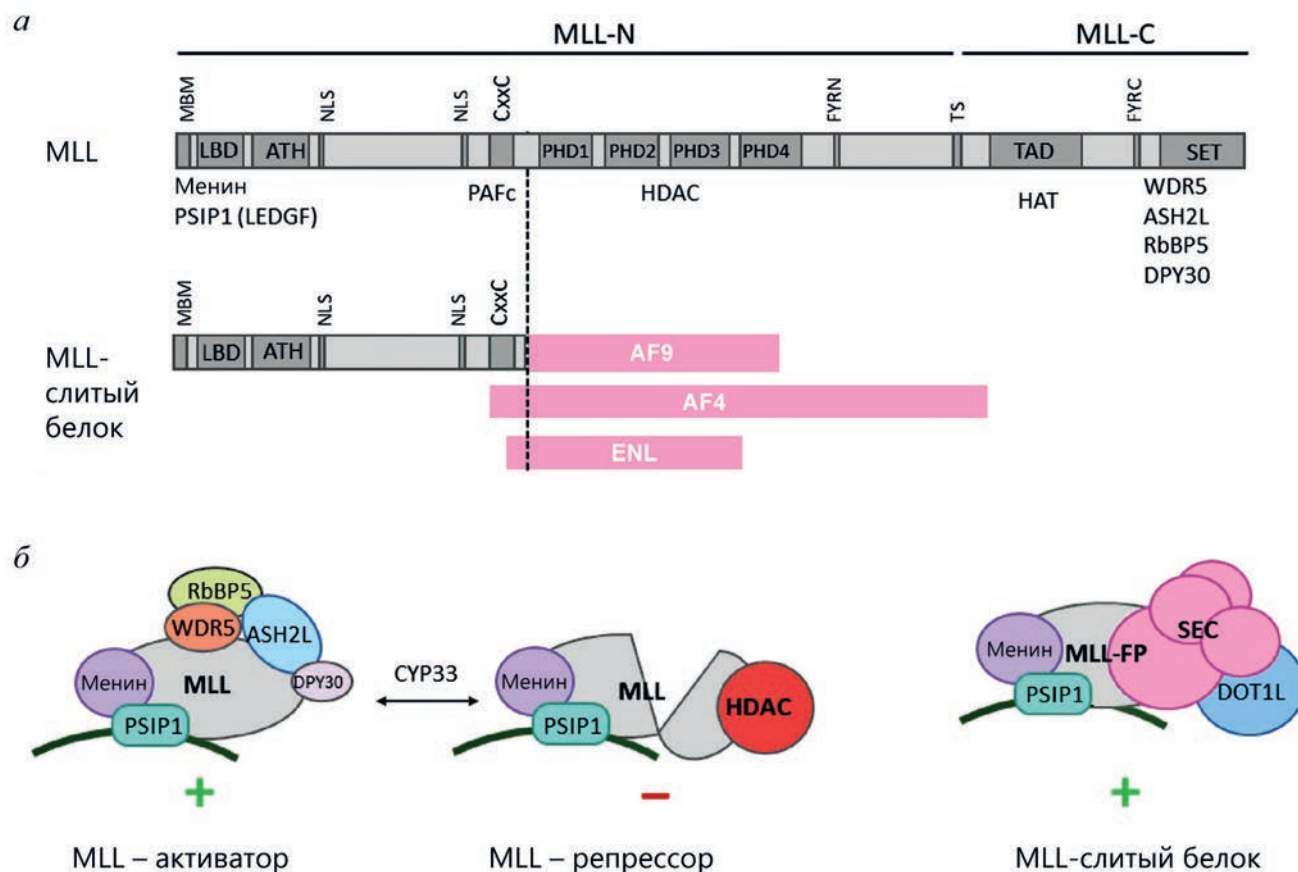


Рис. 4. Белок MLL и слитый с MLL белок. **а** – Доменная структура MLL и MLL-слитого белка. MLL-N и MLL-C – фрагменты, образующиеся при расщеплении таспазой; MBM – менин-связывающий мотив; LBD – LEDGF(PSIP1)-связывающий домен; ATH – участки AT-hook; NLS – сигналы ядерной локализации; CxxC – CxxC-домен и окружающие его участки; PHD1–4 – участки домена PHD; FYRN и FYRC – FY-rich участки N- и C-доменов; TS – сайты расщепления пре-MLL таспазой; TAD – трансактивирующий домен; SET – SET-домен. Возле доменов перечислены белки, с которыми они взаимодействуют. **б** – Комплексы, формируемые нормальным MLL и MLL-слитым белком (MLL-FP). Менин, PSIP1, DPY30, ASH2L, RbBP5, WDR5, DOT1L – белки, взаимодействующие с MLL и MLL-FP; HDAC – гистондеацетилазы; SEC – суперэлонгационный комплекс. По [176, 177, 181]

происходит от партнера по транслокации [56, 176, 180, 182]. Исходя из структуры MLL и функции его доменов понятно, что образование таких слитых белков принципиально нарушает функционирование комплекса на основе MLL.

Необычной особенностью транслокаций с участием гена *MLL* является то, что существует более 100 генов-партнеров *MLL* по транслокации [7]. И несмотря на такое разнообразие, большинство случаев лейкозов с транслокациями *MLL* схожи по своим клиническим проявлениям [183, 184]. Это можно объяснить, во-первых, сходными точками разрыва в слитых генах, и во-вторых, тем, что большинство пациентов с перестройкой *MLL* несут транслокации с одним из следующих генов: *ENL*, *AF9*, *AF4*, *ELL* и *AF10*, – тогда как остальные транслокации встречаются крайне редко. В частности, все транслокации *MLL*, вызванные действием ингибиторов ДНК-топоизомеразы II,

как раз происходят с этими партнерами, за исключением *MLL-CREBBP* (таблица).

Схожесть транслокаций с участием генов *ENL*, *AF9*, *AF4*, *ELL* и *AF10* объясняется тем, что они кодируют белки, образующие вместе с фактором Р-TEFb суперэлонгационный комплекс, необходимый для осуществления эффективной элонгации транскрипции РНК-полимеразой II [185, 186]. И когда MLL оказывается слит с одним из компонентов этого комплекса, то он привлекает к ДНК весь комплекс целиком, а также фактор DOT1L [187, 188]. Р-TEFb, входящий в данный комплекс, осуществляет фосфорилирование С-концевого домена РНК-полимеразы II, что стимулирует элонгацию транскрипции, а DOT1L осуществляет ди- и триметилирование H3K79 – эта метка ассоциирована с активным хроматином [189–190]. Следует также отметить, что при транслокации *MLL* теряется участок гена, который кодирует PHD-домен, отвечающий

за переключение MLL в репрессирующее состояние. В итоге остаток MLL полностью теряет способность к репрессии генов, а слитый с ним суперэлонгационный комплекс и фактор DOT1L напрямую активируют транскрипцию тех генов, с которыми связывается MLL.

Механизм развития лейкоза при транслокации MLL включает активацию транскрипции генов НохА-кластера, а также генов, кодирующих белки сигнальных путей, например, генов малой GTPазы RAC1 и рецепторной тирозинкиназы FLT3. Это приводит к опухолевой трансформации кроветворных клеток. Показано, что слитые MLL-белки стимулируют экспрессию гомеобоксных генов *HOXA*, *MEIS1* и *PBX*, генов-транскрипционных регуляторов *AML1* и *MYC* и других генов. Промоторы активированных генов содержат метки активного хроматина H3K4me3 и H3K27ac, а также имеют повышенный уровень H3K79me2 [146, 148, 191].

В случае транслокации MLL–CREBBP механизм влияния слитого белка на клетку схож — CREBBP является гистонацетилтрансферазой, которая навешивает активирующие метки на гистоны, а сам MLL разорван в том же месте, что и при описанных выше его транслокациях [133].

Также в последнее время накапливается все больше данных о том, что для развития лейкоза необходима хотя бы кратковременная экспрессия слитого гена, полученного в результате реципрокной транслокации. Например, выдвигается гипотеза, что продукт реципрокной транслокации AF4–MLL является глобальным активатором транскрипции, так как C-конец белка MLL вносит активирующие метки неспецифично, в отличие от интактного MLL [192]. Такие модификации могут привести к реактивации участков генома, которые уже были инактивированы в процессе дифференцировки клеток. В числе реактивированных могут быть гены, работающие в стволовых клетках, например, *NANOG* и *OCT4*, что было показано для клеток с транслокацией t(4;11) [193, 194]. Эксперименты показывают, что для активации хроматина достаточно экспрессии AF4–MLL в течение лишь 48 часов, при этом изменения в статусе хроматина остаются в популяции клеток надолго [195].

Таким образом, при транслокациях с участием MLL происходит потеря контроля над транскрипцией генов, работающих в первую очередь в незрелых клетках. Активируются гены, отвечающие за пролиферацию, и теряется контроль над делением клеток, что приводит к развитию лейкоза.

Общие закономерности развития лейкозов при перестройках *AML1* и *MLL*. Можно подытожить, что гены *AML1* и *MLL*, перестраиваемые в результате терапии ингибиторами ДНК-топоизомераз II, оба в норме регулируют транскрипцию в гемопоэтических клетках. А образующиеся в результате транслокации слитые AML1- и MLL-белки приводят к разбалансировке транскрипции в этих клетках. При этом, видимо, не существует единственного варианта изменения паттерна экспрессии генов — в клоне клеток с транслокацией, скорее всего, появляются клетки с разным паттерном экспрессии. И из этих эпигенетически разнообразных клеток постепенно выделяются наиболее активно делящиеся, которые становятся лейкозными клетками [196].

При развитии опухоли в клетках происходят и соматические мутации, которые могут повышать приспособленность опухолевых клонов: их возможность сопротивляться иммунной системе и повышенная скорость деления. Однако при делении клеток передаются не только мутации, но и эпигенетические метки, причем накопление эпигенетических изменений происходит гораздо быстрее, чем мутаций [197]. И эффект от изменения уровня экспрессии гена часто более масштабный, чем от точечной мутации. Поэтому клетки с транслокациями *AML1* и *MLL*, в результате которых наблюдаются масштабные эпигенетические эффекты, быстро развиваются в опасные лейкозы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Вызванные терапией лейкозы — тяжелый побочный эффект терапии первичных опухолей топоизомеразными ядами. «Отравленная» ДНК-топоизомеразы типа II становится причиной образования двуцепочечных разрывов в геноме, что ведет к гибели клеток первичной опухоли. Однако в организме существуют и другие активно делящиеся клетки, например — предшественники клеток крови. Поэтому в ходе терапии топоизомеразными ядами в геноме таких клеток также возникают разрывы. В частности, разрывы возникают в генах *AML1*, *MLL* и их партнерах по перестройкам. Особый характер таких разрывов — наличие на концах разрывов ковалентно связанных субъединиц топоизомеразы — осложняет их репарацию. Концы разрывов могут отделяться друг от друга и встречаться с концами разрывов в генах-партнерах, в результате чего возникают хромосомные транслокации. Образующиеся слитые белки теряют часть функций нормальных

белков AML1 и MLL, а также приобретают новые функции, обусловленные функциональной активностью фрагментов (доменов) белков-партнеров. В результате в некоторых клетках костного мозга нарушается регуляция экспрессии генов, в норме регулируемых белками AML1 и MLL, что приводит к усилению экспрессии генов, стимулирующих пролиферацию клеток и к опухолевой трансформации клеток.

Повышенная частота встречаемости транслокаций с участием генов *AML1* и *MLL* вследствие обработки клеток ингибиторами ДНК-топоизомераз II (рекуррентный характер таких перестроек) так же, как и отличие от хромосомных aberrаций при других типах вторичных неоплазий, объясняется целым рядом факторов, а именно: повышенной частотой возникновения разрывов в этих генах при ингибировании ДНК-топоизомеразы и селективным преимуществом, которое дает клеткам экспрессия в них белковых продуктов слитых генов. При этом сложность репарации таких разрывов повышает их подвижность в ядре, что позволяет встретиться генам-партнерам, которые в норме удалены друг от друга.

Отдельно отметим, что разрывы в ДНК могут быть индуцированы и не ингибированной топоизомеразой [49], правда вероятность таких разрывов значительно меньше, чем при ингибировании топоизомеразы. Тем не менее для вторичных лейкозов, вызванных предшествующей терапией метотрексатом, характерны некоторые транслокации, характерные для лейкозов, вызванных терапией ингибиторами ДНК-топоизомеразы [198]. Влияние метотрексата на образование транслокаций еще предстоит подробно изучить, сейчас имеются предварительные данные, что он повышает вероятность транслокации *AML1-ETO* в экспериментах на клетках [88].

Несмотря на то что в последние годы было получено много экспериментальных подтверждений такого механизма развития вторичного лейкоза, ряд вопросов еще ожидает своего ответа. Среди таких вопросов: какое влияние оказывают различные партнеры по перестройкам генов *MLL* и *AML1*, а также положение точки разрыва внутри этих генов на развитие лейкоза, его клиническое проявление и прогноз? Как вещества, применяемые в терапии первичных опухолей совместно с топоизомеразными ядами, могут влиять на возникновение хромосомных транслокаций и их спектр? Ответить на эти вопросы помогут результаты экспериментов на клеточных моделях, где изучается как действие транслокаций на фенотип клеток [199, 200], так и сам процесс образования транслокаций [88, 201]. Будущие исследования на таких моделях могут не только пролить свет на эти вопросы, но также выявить способы снижения риска возникновения и развития вторичных лейкозов.

Вклад авторов. Все авторы участвовали в написании данного обзора.

Финансирование. Исследование выполнено при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение 075-15-2021-1062) и Междисциплинарной научно-образовательной школы Московского университета «Молекулярные технологии живых систем и синтетическая биология».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Becker, M. W., and Jordan, C. T. (2011) Leukemia stem cells in 2010: Current understanding and future directions, *Blood Rev.*, **25**, 75-81, doi: 10.1016/j.blre.2010.11.001.
2. Wang, J. H. (2012) Mechanisms and impacts of chromosomal translocations in cancers, *Front. Med.*, **6**, 263-274, doi: 10.1007/s11684-012-0215-5.
3. Andersson, A. K., Ma, J., Wang, J., Chen, X., Giedman, A. L., Dang, J., Nakitandwe, J., Holmfeldt, L., Parker, M., Easton, J., Huether, R., Kriwacki, R., Rusch, M., Wu, G., Li, Y., Mulder, H., Raimondi, S., Pounds, S., Kang, G., Shi, L., Becksfort, J., Gupta, P., Payne-Turner, D., Vadodaria, B., Boggs, K., Yergeau, D., Manne, J., Song, G., Edmonson, M., Nagahawatte, P., Wei, L., Cheng, C., Pei, D., Sutton, R., Venn, N. C., Chetcuti, A., Rush, A., Catchpoole, D., Heldrup, J., Fioretos, T., Lu, C., Ding, L., Pui, C. H., Shurtleff, S., Mullighan, C. G., Mardis, E. R., Wilson, R. K., Gruber, T. A., Zhang, J., and Downing, J. R. (2015) The landscape of somatic mutations in infant MLL-rearranged acute lymphoblastic leukemias, *Nat. Genet.*, **47**, 330-337, doi: 10.1038/ng.3230.
4. Greaves, M. (2015) When one mutation is all it takes, *Cancer Cell*, **27**, 433-434, doi: 10.1016/j.ccell.2015.03.016.

5. Balgobind, B. V., Raimondi, S. C., Harbott, J., Zimmermann, M., Alonzo, T. A., Auvrignon, A., Beverloo, H. B., Chang, M., Creutzig, U., Dworzak, M. N., Forestier, E., Gibson, B., Hasle, H., Harrison, C. J., Heerema, N. A., Kaspers, G. J. L., Leszl, A., Litvinko, N., Lo Nigro, L., Morimoto, A., Perot, C., Pieters, R., Reinhardt, D., Rubnitz, J. E., Smith, F. O., Stary, J., Stasevich, I., Strehl, S., Taga, T., Tomizawa, D., Webb, D., Zemanova, Z., Zwaan, C. M., and Van Den Heuvel-Eibrink, M. M. (2009) Novel prognostic subgroups in childhood 11q23/MLL-rearranged acute myeloid leukemia: results of an international retrospective study, *Blood*, **114**, 2489-2496, doi: 10.1182/blood-2009-04-215152.
6. Döhner, H., Estey, E., Grimwade, D., Amadori, S., Appelbaum, F. R., Büchner, T., Dombret, H., Ebert, B. L., Fenaux, P., Larson, R. A., Levine, R. L., Lo-Coco, F., Naoe, T., Niederwieser, D., Ossenkoppele, G. J., Sanz, M., Sierra, J., Tallman, M. S., Tien, H. F., Wei, A. H., Löwenberg, B., and Bloomfield, C. D. (2017) Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel, *Blood*, **129**, 424-447, doi: 10.1182/blood-2016-08-733196.
7. Meyer, C., Burmeister, T., Gröger, D., Tsaur, G., Fechina, L., Renneville, A., Sutton, R., Venn, N. C., Emerenciano, M., Pombo-De-Oliveira, M. S., Barbieri Blunck, C., Almeida Lopes, B., Zuna, J., Trka, J., Ballerini, P., Lapillonne, H., De Braekeleer, M., Cazzaniga, G., Corral Abascal, L., Van Der Velden, V. H. J., Delabesse, E., Park, T. S., Oh, S. H., Silva, M. L. M., Lund-Aho, T., Juvonen, V., Moore, A. S., Heidenreich, O., Vormoor, J., Zerkalenkova, E., Olshanskaya, Y., Bueno, C., Menendez, P., Teigler-Schlegel, A., Zur Stadt, U., Lentjes, J., Göhring, G., Kustanovich, A., Aleinikova, O., Schäfer, B. W., Kubetzko, S., Madsen, H. O., Gruhn, B., Duarte, X., Gameiro, P., Lippert, E., Bidet, A., Cayuela, J. M., Clappier, E., Alonso, C. N., Zwaan, C. M., Van Den Heuvel-Eibrink, M. M., Izraeli, S., Trakhtenbrot, L., Archer, P., Hancock, J., Möricke, A., Alten, J., Schrappe, M., Stanulla, M., Strehl, S., Attarbaschi, A., Dworzak, M., Haas, O. A., Panzer-Grümayer, R., Sedék, L., Szczepa, T., Caye, A., Suarez, L., Cavé, H., and Marschalek, R. (2018) The MLL recombinome of acute leukemias in 2017, *Leukemia*, **32**, 273-284, doi: 10.1038/leu.2017.213.
8. Lomov, N., Zerkalenkova, E., Lebedeva, S., Viushkov, V., and Rubtsov, M. A. (2021) Cytogenetic and molecular genetic methods for chromosomal translocations detection with reference to the *KMT2A/MLL* gene, *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.*, **58**, 180-206, doi: 10.1080/10408363.2020.1844135.
9. Germini, D., Tsfasman, T., Klibi, M., El-Amine, R., Pichugin, A., Iarovaia, O. V., Bilhou-Nabera, C., Subra, F., Bou Saada, Y., Sukhanova, A., Boutboul, D., Raphaël, M., Wiels, J., Razin, S. V., Bury-Moné, S., Oksenhendler, E., Lipinski, M., and Vassetzky, Y. S. (2017) HIV Tat induces a prolonged MYC re-localization next to IGH in circulating B-cells, *Leukemia*, **31**, 2515-2522, doi: 10.1038/leu.2017.106.
10. Grande, B. M., Gerhard, D. S., Jiang, A., Griner, N. B., Abramson, J. S., Alexander, T. B., Allen, H., Ayers, L. W., Bethony, J. M., Bhatia, K., Bowen, J., Casper, C., Choi, J. K., Culibrk, L., Davidsen, T. M., Dyer, M. A., Gastier-Foster, J. M., Gesuwan, P., Greiner, T. C., Gross, T. G., Hanf, B., Harris, N. L., He, Y., Irvin, J. D., Jaffe, E. S., Jones, S. J. M., Kerchan, P., Knoetze, N., Leal, F. E., Lichtenberg, T. M., Ma, Y., Martin, J. P., Martin, M. R., Mbulaiteye, S. M., Mullighan, C. G., Mungall, A. J., Namirembe, C., Novik, K., Noy, A., Ogwang, M. D., Omoding, A., Orem, J., Reynolds, S. J., Rushton, C. K., Sandlund, J. T., Schmitz, R., Taylor, C., Wilson, W. H., Wright, G. W., Zhao, E. Y., Marra, M. A., Morin, R. D., and Staudt, L. M. (2019) Genome-wide discovery of somatic coding and noncoding mutations in pediatric endemic and sporadic Burkitt lymphoma, *Blood*, **133**, 1313-1324, doi: 10.1182/blood-2018-09-871418.
11. Lieber, M. R. (2016) Mechanisms of human lymphoid chromosomal translocations, *Nat. Rev. Cancer*, **16**, 387-398, doi: 10.1038/nrc.2016.40.
12. Roos, W. P., and Kaina, B. (2006) DNA damage-induced cell death by apoptosis, *Trends Mol. Med.*, **12**, 440-450, doi: 10.1016/j.molmed.2006.07.007.
13. Bhatia, S. (2013) Therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia, *Semin. Oncol.*, **40**, 666-675, doi: 10.1053/j.seminoncol.2013.09.013.
14. Schoch, C., Kern, W., Schnittger, S., Hiddemann, W., and Haferlach, T. (2004) Karyotype is an independent prognostic parameter in therapy-related acute myeloid leukemia (t-AML): an analysis of 93 patients with t-AML in comparison to 1091 patients with *de novo* AML, *Leukemia*, **18**, 120-125, doi: 10.1038/sj.leu.2403187.
15. Borthakur, G., and Estey, E. E. (2007) Therapy-related acute myelogenous leukemia and myelodysplastic syndrome, *Curr. Oncol. Rep.*, **9**, 373-377, doi: 10.1007/s11912-007-0050-z.
16. Godley, L. A., and Larson, R. A. (2008) Therapy-related myeloid leukemia, *Semin. Oncol.*, **35**, 418-429, doi: 10.1053/j.seminoncol.2008.04.012.
17. Østgård, L. S. G., Medeiros, B. C., Sengeløv, H., Nørgaard, M., Andersen, M. K., Dufva, I., Friis, L. S., Kjeldsen, E., Marcher, C. W., Preiss, B., Severinsen, M., and Nørgaard, J. M. (2015) Epidemiology and clinical significance of secondary and therapy-related acute myeloid leukemia: A national population-based cohort study, *J. Clin. Oncol.*, **33**, 3641-3649, doi: 10.1200/JCO.2014.60.0890.
18. Tiruneh, T., Enawgaw, B., and Shiferaw, E. (2020) Genetic pathway in the pathogenesis of therapy-related myeloid neoplasms: a literature review, *Oncol. Ther.*, **8**, 45-57, doi: 10.1007/s40487-020-00111-7.

19. Pedersen-Bjergaard, J., Andersen, M. K., Christiansen, D. H., and Nerlov, C. (2002) Genetic pathways in therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia, *Blood*, **99**, 1909-1912, doi: 10.1182/blood.V99.6.1909.
20. Czader, M., and Orazi, A. (2009) Therapy-related myeloid neoplasms, *Am. J. Clin. Pathol.*, **132**, 410-425, doi: 10.1309/AJCPD85MCOHHCOMQ.
21. Kayser, S., Döhner, K., Krauter, J., Köhne, C.-H., Horst, H. A., Held, G., von Lilienfeld-Toal, M., Wilhelm, S., Kündgen, A., Götze, K., Rummel, M., Nachbaur, D., Schlegelberger, B., Göhring, G., Späth, D., Morlok, C., Zucknick, M., Ganser, A., Döhner, H., Schlenk, R. F., and German-Austrian AMLSG (2011) The impact of therapy-related acute myeloid leukemia (AML) on outcome in 2853 adult patients with newly diagnosed AML, *Blood*, **117**, 2137-2145, doi: 10.1182/blood-2010-08-301713.
22. McNerney, M. E., Godley, L. A., and Le Beau, M. M. (2017) Therapy-related myeloid neoplasms: When genetics and environment collide, *Nat. Rev. Cancer*, **17**, 513-527, doi: 10.1038/nrc.2017.60.
23. Ratain, M. J., and Rowley, J. D. (1992) Therapy-related acute myeloid leukemia secondary to inhibitors of topoisomerase II: From the bedside to the target genes, *Ann. Oncol.*, **3**, 107-111, doi: 10.1093/oxford-journals.annonc.a058121.
24. Mauritzson, N., Albin, M., Rylander, L., Billström, R., Ahlgren, T., Mikoczy, Z., Björk, J., Strömberg, U., Nilsson, P., Mitelman, F., Hagmar, L., and Johansson, B. (2002) Pooled analysis of clinical and cytogenetic features in treatment-related and *de novo* adult acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes based on a consecutive series of 761 patients analyzed 1976-1993 and on 5098 unselected cases reported in the literature 1974-2001, *Leukemia*, **16**, 2366-2378, doi: 10.1038/sj.leu.2402713.
25. Hande, K. R. (1998) Etoposide: four decades of development of a topoisomerase ii inhibitor, *Eur. J. Cancer*, **34**, 1514-1521, doi: 10.1016/S0959-8049(98)00228-7.
26. King, L. S., and Sullivan, M. (1946) The similarity of the effect of podophyllin and colchicine and their use in the treatment of condylomata acuminata, *Science*, **104**, 244-245, doi: 10.1126/science.104.2698.244.
27. Greenspan, E. M. (1950) Effect of alpha-peltatin, beta-peltatin, and podophyllotoxin on lymphomas and other transplanted tumors, *J. Natl. Cancer Inst.*, **10**, 1295-1333.
28. Baldwin, E. L., and Osheroff, N. (2005) Etoposide, topoisomerase II and cancer, *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents*, **5**, 363-372, doi: 10.2174/1568011054222364.
29. Burden, D. A., and Osheroff, N. (1998) Mechanism of action of eukaryotic topoisomerase II and drugs targeted to the enzyme, *Biochim. Biophys. Acta*, **1400**, 139-154, doi: 10.1016/S0167-4781(98)00132-8.
30. Wozniak, A. J., and Ross, W. E. (1983) DNA damage as a basis for 4'-demethylepipodophyllotoxin-9-(4,6-O-ethylidene-beta-D-glucopyranoside) (etoposide) cytotoxicity, *Cancer Res.*, **43**, 120-124.
31. Watson, J. D., and Crick, F. H. C. (1953) Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid, *Nature*, **171**, 964-967, doi: 10.1038/171964b0.
32. Delbrück, M. (1954) On the replication of desoxyribonucleic acid (DNA), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **40**, 783-788, doi: 10.1073/pnas.40.9.783.
33. McKie, S. J., Neuman, K. C., and Maxwell, A. (2021) DNA topoisomerases: Advances in understanding of cellular roles and multi-protein complexes via structure-function analysis, *BioEssays*, **43**, e2000286, doi: 10.1002/bies.202000286.
34. Champoux, J. J. (2001) DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism, *Annu. Rev. Biochem.*, **70**, 369-413, doi: 10.1146/annurev.biochem.70.1.369.
35. Bliska, J. B., and Cozzarelli, N. R. (1987) Use of site-specific recombination as a probe of DNA structure and metabolism *in vivo*, *J. Mol. Biol.*, **194**, 205-218, doi: 10.1016/0022-2836(87)90369-X.
36. Zechiedrich, E. L., and Cozzarelli, N. R. (1995) Roles of topoisomerase IV and DNA gyrase in DNA unlinking during replication in *Escherichia coli*, *Genes Dev.*, **9**, 2859-2869, doi: 10.1101/gad.9.22.2859.
37. Yang, L., Wold, M. S., Li, J. J., Kelly, T. J., and Liu, L. F. (1987) Roles of DNA topoisomerases in simian virus 40 DNA replication *in vitro*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 950-954, doi: 10.1073/pnas.84.4.950.
38. Buchenau, P., Saumweber, H., and Arndt-Jovin, D. J. (1993) Consequences of topoisomerase II inhibition in early embryogenesis of *Drosophila* revealed by *in vivo* confocal laser scanning microscopy, *J. Cell Sci.*, **104** (Pt 4), 1175-1185, doi: 10.1242/jcs.104.4.1175.
39. Liu, L. F., Rowe, T. C., Yang, L., Tewey, K. M., and Chen, G. L. (1983) Cleavage of DNA by mammalian DNA topoisomerase II, *J. Biol. Chem.*, **258**, 15365-15370, doi: 10.1016/S0021-9258(17)43815-4.
40. Schmidt, B. H., Osheroff, N., and Berger, J. M. (2012) Structure of a topoisomerase II-DNA-nucleotide complex reveals a new control mechanism for ATPase activity, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **19**, 1147-1154, doi: 10.1038/nsmb.2388.
41. Nitiss, J. L. (2009) DNA topoisomerase II and its growing repertoire of biological functions, *Nat. Rev. Cancer*, **9**, 327-337, doi: 10.1038/nrc2608.
42. Bates, A. D., Berger, J. M., and Maxwell, A. (2011) The ancestral role of ATP hydrolysis in type II topoisomerases: prevention of DNA double-strand breaks, *Nucleic Acids Res.*, **39**, 6327-6339, doi: 10.1093/nar/gkr258.
43. Bush, N. G., Evans-roberts, K., and Maxwell, A. (2015) Macromolecules DNA topoisomerases, *EcoSal Plus*, **6**, 1-34, doi: 10.1128/ecosalplus.ESP-0010-2014.
44. Bax, B. D., Murshudov, G., Maxwell, A., and Germe, T. (2019) DNA topoisomerase inhibitors: trapping a DNA-cleaving machine in motion, *J. Mol. Biol.*, **431**, 3427-3449, doi: 10.1016/j.jmb.2019.07.008.

45. Vann, K. R., Oviatt, A. A., and Osheroff, N. (2021) Topoisomerase II poisons: converting essential enzymes into molecular scissors, *Biochemistry*, **60**, 1630-1641, doi: 10.1021/acs.biochem.1c00240.
46. Robinson, M. J., and Osheroff, N. (1991) Effects of antineoplastic drugs on the post-strand-passage DNA cleavage/religation equilibrium of topoisomerase II, *Biochemistry*, **30**, 1807-1813, doi: 10.1021/bi00221a012.
47. Yan, H., Tammam, M., and Liao, S. (2016) Collision of trapped topoisomerase 2 with transcription and replication: generation and repair of DNA double-strand breaks with 5' adducts, *Genes (Basel)*, **7**, 32, doi: 10.3390/genes7070032.
48. Riccio, A. A., Schellenberg, M. J., and Williams, R. S. (2020) Molecular mechanisms of topoisomerase 2 DNA-protein crosslink resolution, *Cell. Mol. Life Sci.*, **77**, 81-91, doi: 10.1007/s00018-019-03367-z.
49. Swan, R. L., Cowell, I. G., and Austin, C. A. (2022) Mechanisms to repair stalled topoisomerase II-DNA covalent complexes, *Mol. Pharmacol.*, **101**, 24-32, doi: 10.1124/molpharm.121.000374.
50. Tomicic, M. T., and Kaina, B. (2013) Topoisomerase degradation, DSB repair, p53 and IAPs in cancer cell resistance to camptothecin-like topoisomerase I inhibitors, *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer*, **1835**, 11-27, doi: 10.1016/j.bbcan.2012.09.002.
51. Montecucco, A., and Biamonti, G. (2007) Cellular response to etoposide treatment, *Cancer Lett.*, **252**, 9-18, doi: 10.1016/j.canlet.2006.11.005.
52. Kantidze, O. L., and Razin, S. V. (2007) Chemotherapy-related secondary leukemias: a role for DNA repair by error-prone non-homologous end joining in topoisomerase II – induced chromosomal rearrangements, *Gene*, **391**, 76-79, doi: 10.1016/j.gene.2006.12.006.
53. Smith, K. A., Cowell, I. G., Zhang, Y., Sondka, Z., and Austin, C. A. (2014) The role of topoisomerase II beta on breakage and proximity of RUNX1 to partner alleles RUNX1T1 and EVI1, *Genes Chromosomes Cancer*, **53**, 117-128, doi: 10.1002/gcc.22124.
54. Zhang, Y., Strissel, P., Strick, R., Chen, J., Nucifora, G., Le Beau, M. M., Larson, R. A., and Rowley, J. D. (2002) Genomic DNA breakpoints in AML1/RUNX1 and ETO cluster with topoisomerase II DNA cleavage and DNase I hypersensitive sites in t(8;21) leukemia, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 3070-3075, doi: 10.1073/pnas.042702899.
55. Strissel, P. L., Strick, R., Tomek, R. J., Roe, B. A., Rowley, J. D., and Zeleznik-Le, N. J. (2000) DNA structural properties of AF9 are similar to MLL and could act as recombination hot spots resulting in MLL/AF9 translocations and leukemogenesis, *Hum. Mol. Genet.*, **9**, 1671-1679, doi: 10.1093/hmg/9.11.1671.
56. Cowell, I. G., Sondka, Z., Smith, K., Lee, K. C., Manville, C. M., Sidorczuk-Lesthurge, M., Rance, H. A., Padgett, K., Jackson, G. H., Adachi, N., and Austin, C. A. (2012) Model for MLL translocations in therapy-related leukemia involving topoisomerase IIβ-mediated DNA strand breaks and gene proximity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 8989-8994, doi: 10.1073/pnas.1204406109.
57. Lomov, N. A., Viushkov, V. S., Ulianov, S. V., Gavrilov, A. A., Alexeyevsky, D. A., Artemov, A. V., Razin, S. V., and Rubtsov, M. A. (2022) Recurrent translocations in topoisomerase inhibitor-related leukemia are determined by the features of DNA breaks rather than by the proximity of the translocating genes, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 9824, doi: 10.3390/ijms23179824.
58. Rowley, J. D., and Olney, H. J. (2002) International Workshop on the relationship of prior therapy to balanced chromosome aberrations in therapy-related myelodysplastic syndromes and acute leukemia: overview report, *Genes Chromosomes Cancer*, **33**, 331-345, doi: 10.1002/gcc.10040.
59. Pedersen-Bjergaard, J., Andersen, M. K., Andersen, M. T., and Christiansen, D. H. (2008) Genetics of therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia, *Leukemia*, **22**, 240-248, doi: 10.1038/sj.leu.2405078.
60. Imamura, T., Taga, T., Takagi, M., Kawasaki, H., Koh, K., Taki, T., Adachi, S., Manabe, A., and Ishida, Y. (2018) Nationwide survey of therapy-related leukemia in childhood in Japan, *Int. J. Hematol.*, **108**, 91-97, doi: 10.1007/s12185-018-2439-x.
61. Gustafson, S. A., Lin, P., Chen, S. S., Chen, L., Abruzzo, L. V., Luthra, R., Medeiros, L. J., and Wang, S. A. (2009) Therapy-related acute myeloid leukemia with t(8;21) (q22;q22) shares many features with *de novo* acute myeloid leukemia with t(8;21) (q22;q22) but does not have a favorable outcome, *Am. J. Clin. Pathol.*, **131**, 647-655, doi: 10.1309/AJCP5ETHDXO6NCGZ.
62. Slovak, M. L., Bedell, V., Popplewell, L., Arber, D. A., Schoch, C., and Slater, R. (2002) 21q22 balanced chromosome aberrations in therapy-related hematopoietic disorders: report from an international workshop, *Genes Chromosomes Cancer*, **33**, 379-394, doi: 10.1002/gcc.10042.
63. Sood, R., Kamikubo, Y., and Liu, P. (2017) Role of RUNX1 in hematological malignancies, *Blood*, **129**, 2070-2082, doi: 10.1182/blood-2016-10-687830.
64. Tanaka, K., Oshikawa, G., Akiyama, H., Ishida, S., Nagao, T., Yamamoto, M., and Miura, O. (2017) Acute myeloid leukemia with t(3;21)(q26.2;q22) developing following low-dose methotrexate therapy for rheumatoid arthritis and expressing two AML1/MDS1/EVI1 fusion proteins: A case report, *Oncol. Lett.*, **14**, 97-102, doi: 10.3892/ol.2017.6151.
65. Sato, Y., Izumi, T., Kanamori, H., Davis, E. M., Miura, Y., Larson, R. A., Le Beau, M. M., Ozawa, K., and Rowley, J. D. (2002) t(1;3)(p36;p21) is a recurring therapy-related translocation, *Genes Chromosomes Cancer*, **34**, 186-192, doi: 10.1002/gcc.10055.

66. Duhoux, F. P., Ameye, G., Montano-Almendras, C. P., Bahloula, K., Mozziconacci, M. J., Laibe, S., Wlodarska, I., Michaux, L., Talmant, P., Richebourg, S., Lippert, E., Speleman, F., Herens, C., Struski, S., Raynaud, S., Auger, N., Nadal, N., Rack, K., Mugneret, F., Tigaud, I., Lafage, M., Taviaux, S., Roche-Lestienne, C., Latinne, D., Libouton, J. M., Demoulin, J. B., and Poirel, H. A. (2012) PRDM16 (1p36) translocations define a distinct entity of myeloid malignancies with poor prognosis but may also occur in lymphoid malignancies, *Br. J. Haematol.*, **156**, 76-88, doi: 10.1111/j.1365-2141.2011.08918.x.
67. Andersen, M. K., Christiansen, D. H., Jensen, B. A., Ernst, P., Hauge, G., and Pedersen-Bjergaard, J. (2001) Therapy-related acute lymphoblastic leukaemia with MLL rearrangements following DNA topoisomerase II inhibitors, an increasing problem: report on two new cases and review of the literature since 1992, *Br. J. Haematol.*, **114**, 539-543, doi: 10.1046/j.1365-2141.2001.03000.x.
68. Cowell, I. G., and Austin, C. A. (2012) Mechanism of generation of therapy related leukemia in response to anti-topoisomerase II agents, *J. Environ. Res. Public Health*, **9**, 2075-2091, doi: 10.3390/ijerph9062075.
69. Moorman, A. V., Hagemeijer, A., Charrin, C., Rieder, H., and Secker-Walker, L. M. (1998) Clinical profile of 53 patients, *Leukemia*, **12**, 805-810, doi: 10.1038/sj.leu.2401016.
70. Meyer, C., Burmeister, T., Strehl, S., Schneider, B., Hubert, D., Zach, O., Haas, O., Klingebiel, T., Dingermann, T., and Marschalek, R. (2007) Spliced MLL fusions: a novel mechanism to generate functional chimeric MLL-MLLT1 transcripts in t(11;19) (q23;p13.3) leukemia, *Leukemia*, **21**, 588-590, doi: 10.1038/sj.leu.2404542.
71. Lavau, C., Du, C., Thirman, M., and Zeleznik-Le, N. (2000) Chromatin-related properties of CBP fused to MLL generate a myelodysplastic-like syndrome that evolves into myeloid leukemia, *EMBO J.*, **19**, 4655-4664, doi: 10.1093/emboj/19.17.4655.
72. Yoo, B. J., Nam, M. H., Sung, H. J., Lim, C. S., Lee, C. K., Cho, Y. J., Lee, K. N., and Yoon, S. Y. (2011) A case of therapy-related acute lymphoblastic leukemia with t(11;19) (q23;p13.3) and MLL/MLLT1 gene rearrangement, *Korean J. Lab. Med.*, **31**, 13-17, doi: 10.3343/kjlm.2011.31.1.13.
73. Xie, W., Tang, G., Wang, E., Kim, Y., Cloe, A., Shen, Q., Zhou, Y., Garcia-Manero, G., Loghavi, S., Hu, A. Y., Wang, S., Bueso-Ramos, C. E., Kantarjian, H. M., Medeiros, L. J., and Hu, S. (2020) t(11;16) (q23;p13)/KMT2A-CREBBP in hematologic malignancies: presumptive evidence of myelodysplasia or therapy-related neoplasm? *Ann. Hematol.*, **99**, 487-500, doi: 10.1007/s00277-020-03909-7.
74. Soutoglou, E., Dorn, J. F., Sengupta, K., Jasin, M., Nussenzweig, A., Ried, T., Danuser, G., and Misteli, T. (2007) Positional stability of single double-strand breaks in mammalian cells, *Nat. Cell Biol.*, **9**, 675-682, doi: 10.1038/ncb1591.
75. Zhang, Y., McCord, R. P., Ho, Y.-J., Lajoie, B. R., Hildebrand, D. G., Simon, A. C., Becker, M. S., Alt, F. W., and Dekker, J. (2012) Chromosomal translocations are guided by the spatial organization of the genome, *Cell*, **148**, 908-921, doi: 10.1016/j.cell.2012.02.002.
76. Engreitz, J. M., Agarwala, V., and Mirny, L. A. (2012) Three-dimensional genome architecture influences partner selection for chromosomal translocations in human disease, *PLoS One*, **7**, e44196, doi: 10.1371/journal.pone.0044196.
77. Sathitruangsak, C., Righolt, C. H., Klewes, L., Tung Chang, D., Kotb, R., and Mai, S. (2017) Distinct and shared three-dimensional chromosome organization patterns in lymphocytes, monoclonal gammopathy of undetermined significance and multiple myeloma, *Int. J. Cancer*, **140**, 400-410, doi: 10.1002/ijc.30461.
78. Falk, M., Lukasova, E., Gabrielova, B., Ondrej, V., and Kozubek, S. (2007) Chromatin dynamics during DSB repair, *Biochim. Biophys. Acta*, **1773**, 1534-1545, doi: 10.1016/j.bbamcr.2007.07.002.
79. Aymard, F., Aguirrebengoa, M., Guillou, E., Javierre, B. M., Bugler, B., Arnould, C., Rocher, V., Iacovoni, J. S., Biernacka, A., Skrzypczak, M., Ginalski, K., Rowicka, M., Fraser, P., and Legube, G. (2017) Genome-wide mapping of long-range contacts unveils clustering of DNA double-strand breaks at damaged active genes, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **24**, 353-361, doi: 10.1038/nsmb.3387.
80. Wang, H., Nakamura, M., Abbott, T. R., Zhao, D., Luo, K., Yu, C., Nguyen, C. M., Lo, A., Daley, T. P., La Russa, M., Liu, Y., and Qi, L. S. (2019) CRISPR-mediated live imaging of genome editing and transcription, *Science*, **365**, 1301-1305, doi: 10.1126/science.aax7852.
81. Ramsden, D. A., and Nussenzweig, A. (2021) Mechanisms driving chromosomal translocations: lost in time and space, *Oncogene*, **40**, 4263-4270, doi: 10.1038/s41388-021-01856-9.
82. Roukos, V., Voss, T. C., Schmidt, C. K., Lee, S., Wangsa, D., and Misteli, T. (2013) Spatial dynamics of chromosome translocations in living cells, *Science*, **341**, 660-664, doi: 10.1126/science.1237150.
83. Kantidze, O. L., and Razin, S. V. (2009) Chromatin loops, illegitimate recombination, and genome evolution, *BioEssays*, **31**, 278-286, doi: 10.1002/bies.200800165.
84. Canela, A., Maman, Y., Huang, S. N., Wutz, G., Tang, W., Zagnoli-Vieira, G., Callen, E., Wong, N., Day, A., Peters, J. M., Caldecott, K. W., Pommier, Y., and Nussenzweig, A. (2019) Topoisomerase II-induced chromosome breakage and translocation is determined by chromosome architecture and transcriptional activity, *Mol. Cell*, **75**, 252-266.e8, doi: 10.1016/j.molcel.2019.04.030.

85. Graham, T. G. W., Walter, J. C., and Loparo, J. J. (2016) Two-stage synopsis of DNA ends during non-homologous end joining, *Mol. Cell*, **61**, 850-858, doi: 10.1016/j.molcel.2016.02.010.
86. Chaplin, A. K., Hardwick, S. W., Stavridi, A. K., Buehl, C. J., Goff, N. J., Ropars, V., Liang, S., De Oliveira, T. M., Chirgadze, D. Y., Meek, K., Charbonnier, J. B., and Blundell, T. L. (2021) Cryo-EM of NHEJ super-complexes provides insights into DNA repair, *Mol. Cell*, **81**, 3400-3409.e3, doi: 10.1016/j.molcel.2021.07.005.
87. DeFazio, L. G., Stansel, R. M., Griffith, J. D., and Chu, G. (2002) Synapsis of DNA ends by DNA-dependent protein kinase, *EMBO J.*, **21**, 3192-3200, doi: 10.1093/emboj/cdf299.
88. Shmakova, A., Lomov, N., Viushkov, V., Tsfasman, T., Kozhevnikova, Y., Sokolova, D., Pokrovsky, V., Syrkina, M., Germini, D., Rubtsov, M., and Vassetzky, Y. (2023) Cell models with inducible oncogenic translocations allow to evaluate the potential of drugs to favor secondary translocations, *Cancer Commun.*, **43**, 154-158, doi: 10.1002/cac2.12370.
89. Krawczyk, P. M., Borovski, T., Stap, J., Cijssouw, T., ten Cate, R., Medema, J. P., Kanaar, R., Franken, N. A. P., and Aten, J. A. (2012) Chromatin mobility is increased at sites of DNA double-strand breaks, *J. Cell Sci.*, **125**, 2127-2133, doi: 10.1242/jcs.089847.
90. Glukhov, S. I., Rubtsov, M. A., Alexeyevsky, D. A., Alexeevski, A. V., Razin, S. V., and Iarovaia, O. V. (2013) The broken MLL gene is frequently located outside the inherent chromosome territory in human lymphoid cells treated with DNA topoisomerase II poison etoposide, *PLoS One*, **8**, e75871, doi: 10.1371/journal.pone.0075871.
91. Nowell, P. C. (1976) The clonal evolution of tumor cell populations, *Science*, **194**, 23-28, doi: 10.1126/science.959840.
92. Miyoshi, H., Shimizu, K., Kozu, T., Maseki, N., Kaneko, Y., and Ohki, M. (1991) (8;21) breakpoints on chromosome 21 in acute myeloid leukemia are clustered within a limited region of a single gene, AML1, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 10431-10434, doi: 10.1073/pnas.88.23.10431.
93. Roulston, D., Espinosa, R., Nucifora, G., Larson, R. A., Le Beau, M. M., and Rowley, J. D. (1998) CBFA2(AML1) Translocations with novel partner chromosomes in myeloid leukemias: association with prior therapy, *Blood*, **92**, 2879-2885, doi: 10.1182/blood.V92.8.2879.
94. Pedersen-Bjergaard, J., and Rowley, J. D. (1994) The balanced and the unbalanced chromosome aberrations of acute myeloid leukemia may develop in different ways and may contribute differently to malignant transformation, *Blood*, **83**, 2780-2786, doi: 10.1182/blood.V83.10.2780.2780.
95. De Braekeleer, E., Ferec, C., and De Braekeleer, M. (2009) RUNX1 translocations in malignant hemopathies, *Anticancer Res.*, **29**, 1031-1038.
96. Tahirov, T. H., and Bushweller, J. (2017) Structure and biophysics of CBFβ/RUNX and its translocation products, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **962**, 21-31, doi: 10.1007/978-981-10-3233-2_2.
97. Lam, K., and Zhang, D.-E. (2012) RUNX1 and RUNX1-ETO: roles in hematopoiesis and leukemogenesis, *Front. Biosci. Landmark Ed.*, **17**, 1120-1139, doi: 10.2741/3977.
98. Ichikawa, M., Yoshimi, A., Nakagawa, M., Nishimoto, N., Watanabe-Okochi, N., and Kurokawa, M. (2013) A role for RUNX1 in hematopoiesis and myeloid leukemia, *Int. J. Hematol.*, **97**, 726-734, doi: 10.1007/s12185-013-1347-3.
99. Chen, M. J., Yokomizo, T., Zeigler, B. M., Dzierzak, E., and Speck, N. A. (2009) Runx1 is required for the endothelial to haematopoietic cell transition but not thereafter, *Nature*, **457**, 887-891, doi: 10.1038/nature07619.
100. Ottersbach, K. (2019) Endothelial-to-haematopoietic transition: An update on the process of making blood, *Biochem. Soc. Trans.*, **47**, 591-601, doi: 10.1042/BST20180320.
101. Wang, Q., Stacy, T., Binder, M., Marin-Padilla, M., Sharpe, A. H., and Speck, N. A. (1996) Disruption of the Cbfa2 gene causes necrosis and hemorrhaging in the central nervous system and blocks definitive hematopoiesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 3444-3449, doi: 10.1073/pnas.93.8.3444.
102. Gowney, J. D., Shigematsu, H., Li, Z., Lee, B. H., Adelsperger, J., Rowan, R., Curley, D. P., Kutok, J. L., Akashi, K., Williams, I. R., Speck, N. A., and Gilliland, D. G. (2005) Loss of Runx1 perturbs adult hematopoiesis and is associated with a myeloproliferative phenotype, *Blood*, **106**, 494-504, doi: 10.1182/blood-2004-08-3280.
103. Ichikawa, M., Goyama, S., Asai, T., Kawazu, M., Nakagawa, M., Takeshita, M., Chiba, S., Ogawa, S., and Kurokawa, M. (2008) AML1/Runx1 negatively regulates quiescent hematopoietic stem cells in adult hematopoiesis, *J. Immunol.*, **180**, 4402-4408, doi: 10.4049/jimmunol.180.7.4402.
104. Tanaka, Y., Joshi, A., Wilson, N. K., Kinston, S., Nishikawa, S., and Göttgens, B. (2012) The transcriptional programme controlled by Runx1 during early embryonic blood development, *Dev. Biol.*, **366**, 404-419, doi: 10.1016/j.ydbio.2012.03.024.
105. Yamagata, T., Maki, K., and Mitani, K. (2005) Runx1/AML1 in normal and abnormal hematopoiesis, *Int. J. Hematol.*, **82**, 1-8, doi: 10.1532/IJH97.05075.
106. Elagib, K. E., Racke, F. K., Mogass, M., Khetawat, R., Delehanty, L. L., and Goldfarb, A. N. (2003) RUNX1 and GATA-1 coexpression and cooperation in megakaryocytic differentiation, *Blood*, **101**, 4333-4341, doi: 10.1182/blood-2002-09-2708.
107. Kim, W. Y., Sieweke, M., Ogawa, E., Wee, H. J., Englmeier, U., Graf, T., and Yoshiaki, I. (1999) Mutual activation of Ets-1 and AML1 DNA binding by direct

- interaction of their autoinhibitory domains, *EMBO J.*, **18**, 1609-1620, doi: 10.1093/emboj/18.6.1609.
108. Zhang, D. E., Hetherington, C. J., Meyers, S., Rhoades, K. L., Larson, C. J., Chen, H. M., Hiebert, S. W., and Tenen, D. G. (1996) CCAAT enhancer-binding protein (C/EBP) and AML1 (CBF alpha2) synergistically activate the macrophage colony-stimulating factor receptor promoter, *Mol. Cell. Biol.*, **16**, 1231-1240, doi: 10.1128/MCB.16.3.1231.
 109. Kitabayashi, I., Yokoyama, A., Shimizu, K., and Ohki, M. (1998) Interaction and functional cooperation of the leukemia-associated factors AML1 and p300 in myeloid cell differentiation, *EMBO J.*, **17**, 2994-3004, doi: 10.1093/emboj/17.11.2994.
 110. Yagi, R., Chen, L. F., Shigesada, K., Murakami, Y., and Ito, Y. (1999) A WW domain-containing Yes-associated protein (YAP) is a novel transcriptional co-activator, *EMBO J.*, **18**, 2551-2562, doi: 10.1093/emboj/18.9.2551.
 111. Segrelles, C., Paramio, J. M., and Lorz, C. (2018) The transcriptional co-activator YAP: A new player in head and neck cancer, *Oral Oncol.*, **86**, 25-32, doi: 10.1016/j.oraloncology.2018.08.020.
 112. Riddell, A., McBride, M., Braun, T., Nicklin, S. A., Cameron, E., Loughrey, C. M., and Martin, T. P. (2020) RUNX1: an emerging therapeutic target for cardiovascular disease, *Cardiovasc. Res.*, **116**, 1410-1423, doi: 10.1093/cvr/cvaa034.
 113. Kellaway, S. G., Coleman, D. J. L., Cockerill, P. N., Raghavan, M., and Bonifer, C. (2022) Molecular basis of hematological disease caused by inherited or acquired RUNX1 mutations, *Exp. Hematol.*, **111**, 1-12, doi: 10.1016/j.exphem.2022.03.009.
 114. Lutterbach, B., Westendorf, J. J., Linggi, B., Isaac, S., Seto, E., and Hiebert, S. W. (2000) A mechanism of repression by acute myeloid leukemia-1, the target of multiple chromosomal translocations in acute leukemia, *J. Biol. Chem.*, **275**, 651-656, doi: 10.1074/jbc.275.1.651.
 115. Imai, Y., Kurokawa, M., Yamaguchi, Y., Izutsu, K., Nitta, E., Mitani, K., Satake, M., Noda, T., Ito, Y., and Hirai, H. (2004) The corepressor mSin3A regulates phosphorylation-induced activation, intranuclear location, and stability of AML1, *Mol. Cell. Biol.*, **24**, 1033-1043, doi: 10.1128/MCB.24.3.1033-1043.2004.
 116. Seo, W., Tanaka, H., Miyamoto, C., Levanon, D., Groner, Y., and Taniuchi, I. (2012) Roles of VWRPY motif-mediated gene repression by Runx proteins during T-cell development, *Immunol. Cell Biol.*, **90**, 827-830, doi: 10.1038/icb.2012.6.
 117. Alkadi, H., McKellar, D., Zhen, T., Karpova, T., Garrett, L. J., Gao, Y., Alsadhan, A. A., Kwon, E. M., Greene, J. J., Ball, D. A., Cheng, L., Sorrell, A. D., and Liu, P. P. (2018) The VWRPY domain is essential for RUNX1 function in hematopoietic progenitor cell maturation and megakaryocyte differentiation, *Blood*, **132** (Supplement 1), 1319, doi: 10.1182/blood-2018-99-113400.
 118. Huret, J. L., Ahmad, M., Arsaban, M., Bernheim, A., Cigna, J., Desangles, F., Guignard, J. C., Jacquemot-Perbal, M. C., Labarussias, M., Leberre, V., Malo, A., Morel-Pair, C., Mossafa, H., Potier, J. C., Texier, G., Vigui, F., Wan-Senon, S. Y. C., Zasadzinski, A., and Dessen, P. (2013) Atlas of genetics and cytogenetics in oncology and haematology in 2013, *Nucleic Acids Res.*, **41**, D920-D924, doi: 10.1093/nar/gks1082.
 119. Peterson, L. F., and Zhang, D. E. (2004) The 8;21 translocation in leukemogenesis, *Oncogene*, **23**, 4255-4262, doi: 10.1038/sj.onc.1207727.
 120. Davis, J. N., McGhee, L., and Meyers, S. (2003) The ETO (MTG8) gene family, *Gene*, **303**, 1-10, doi: 10.1016/S0378-1119(02)01172-1.
 121. Hiebert, S. W., Reed-Inderbitzin, E. F., Amann, J., Irvin, B., Durst, K., and Linggi, B. (2003) The t(8;21) fusion protein contacts co-repressors and histone deacetylases to repress the transcription of the p14ARF tumor suppressor, *Blood Cells Mol. Dis.*, **30**, 177-183, doi: 10.1016/S1079-9796(03)00021-4.
 122. Hayashi, Y., Harada, Y., and Harada, H. (2022) Myeloid neoplasms and clonal hematopoiesis from the RUNX1 perspective, *Leukemia*, **36**, 1203-1214, doi: 10.1038/s41375-022-01548-7.
 123. Uhlén, M., Fagerberg, L., Hallström, B. M., Lindskog, C., Oksvold, P., Mardinoglu, A., Sivertsson, Å., Kampf, C., Sjöstedt, E., Asplund, A., Olsson, I. M., Edlund, K., Lundberg, E., Navani, S., Szgyarto, C. A. K., Odeberg, J., Djureinovic, D., Takanen, J. O., Hober, S., Alm, T., Edqvist, P. H., Berling, H., Tegel, H., Mulder, J., Rockberg, J., Nilsson, P., Schwenk, J. M., Hamsten, M., Von Feilitzen, K., Forsberg, M., Persson, L., Johansson, F., Zwahlen, M., Von Heijne, G., Nielsen, J., and Pontén, F. (2015) Tissue-based map of the human proteome, *Science*, **347**, 1260419, doi: 10.1126/science.1260419.
 124. Perry, C., Eldor, A., and Soreq, H. (2002) Runx1/AML1 in leukemia: disrupted association with diverse protein partners, *Leuk. Res.*, **26**, 221-228, doi: 10.1016/S0145-2126(01)00128-X.
 125. Gelmetti, V., Zhang, J., Fanelli, M., Minucci, S., Pelicci, P. G., and Lazar, M. A. (1998) Aberrant recruitment of the nuclear receptor corepressor-histone deacetylase complex by the acute myeloid leukemia fusion partner ETO, *Mol. Cell. Biol.*, **18**, 7185-7191, doi: 10.1128/MCB.18.12.7185.
 126. Lutterbach, B., Westendorf, J. J., Linggi, B., Patten, A., Moniwa, M., Davie, J. R., Huynh, K. D., Bardwell, V. J., Lavinsky, R. M., Rosenfeld, M. G., Glass, C., Seto, E., and Hiebert, S. W. (1998) ETO, a target of t(8;21) in acute leukemia, interacts with the N-CoR and mSin3 corepressors, *Mol. Cell. Biol.*, **18**, 7176-7184, doi: 10.1128/MCB.18.12.7176.
 127. Wang, L., Gural, A., Sun, X. J., Zhao, X., Perna, F., Huang, G., Hatlen, M. A., Vu, L., Liu, F., Xu, H., Asai, T., Xu, H., Deblasio, T., Menendez, S., Voza, F., Jiang, Y., Cole, P. A., Zhang, J., Melnick, A.,

- Roeder, R. G., and Nimer, S. D. (2011) The leukemogenicity of AML1-ETO is dependent on site-specific lysine acetylation, *Science*, **333**, 765-769, doi: 10.1126/science.1201662.
128. Otálora-Otálora, B. A., Henríquez, B., López-Kleine, L., and Rojas, A. (2019) RUNX family: oncogenes or tumor suppressors (review), *Oncol. Rep.*, **42**, 3-19, doi: 10.3892/or.2019.7149.
129. Rejeski, K., Duque-Afonso, J., and Lübbert, M. (2021) AML1/ETO and its function as a regulator of gene transcription via epigenetic mechanisms, *Oncogene*, **40**, 5665-5676, doi: 10.1038/s41388-021-01952-w.
130. Ben-Ami, O., Friedman, D., Leshkowitz, D., Goldenberg, D., Orlovsky, K., Pencovich, N., Lotem, J., Tanay, A., and Groner, Y. (2013) Addiction of t(8;21) and inv(16) acute myeloid leukemia to native RUNX1, *Cell Rep.*, **4**, 1131-1143, doi: 10.1016/j.celrep.2013.08.020.
131. Van der Kouwe, E., and Staber, P. B. (2019) RUNX1-ETO: Attacking the epigenome for genomic instable Leukemia, *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, 350, doi: 10.3390/ijms20020350.
132. Ptasinska, A., Assi, S. A., Mannari, D., James, S. R., Williamson, D., Dunne, J., Hoogenkamp, M., Wu, M., Care, M., McNeill, H., Cauchy, P., Cullen, M., Tooze, R. M., Tenen, D. G., Young, B. D., Cockerill, P. N., Westhead, D. R., Heidenreich, O., and Bonifer, C. (2012) Depletion of RUNX1/ETO in t(8;21) AML cells leads to genome-wide changes in chromatin structure and transcription factor binding, *Leukemia*, **26**, 1829-1841, doi: 10.1038/leu.2012.49.
133. Yuan, Y., Zhou, L., Miyamoto, T., Iwasaki, H., Harakawa, N., Hetherington, C. J., Burel, S. A., Lagasse, E., Weissman, I. L., Akashi, K., and Zhang, D.-E. (2001) AML1-ETO expression is directly involved in the development of acute myeloid leukemia in the presence of additional mutations, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 10398-10403, doi: 10.1073/pnas.171321298.
134. Higuchi, M., O'Brien, D., Kumaravelu, P., Lenny, N., Yeoh, E. J., and Downing, J. R. (2002) Expression of a conditional AML1-ETO oncogene bypasses embryonic lethality and establishes a murine model of human t(8;21) acute myeloid leukemia, *Cancer Cell*, **1**, 63-74, doi: 10.1016/S1535-6108(02)00016-8.
135. Kozu, T., Fukuyama, T., Yamami, T., Akagi, K., and Kaneko, Y. (2005) MYND-less splice variants of AML1-MTG8 (RUNX1=CBFA2T1) are expressed in leukemia with t(8;21), *Genes Chromosomes Cancer*, **43**, 45-53, doi: 10.1002/gcc.20165.
136. Yan, M., Kanbe, E., Peterson, L. F., Boyapati, A., Miao, Y., Wang, Y., Chen, I. M., Chen, Z., Rowley, J. D., Willman, C. L., and Zhang, D. E. (2006) A previously unidentified alternatively spliced isoform of t(8;21) transcript promotes leukemogenesis, *Nat. Med.*, **12**, 945-949, doi: 10.1038/nm1443.
137. Slany, R. K. (2009) The molecular biology of mixed lineage leukemia, *Haematologica*, **94**, 984-993, doi: 10.3324/haematol.2008.002436.
138. Mirro, J., Zipf, T. F., Pui, C. H., Kitchingman, G., Williams, D., Melvin, S., Murphy, S. B., and Stass, S. (1985) Acute mixed lineage leukemia: Clinicopathologic correlations and prognostic significance, *Blood*, **66**, 1115-1123, doi: 10.1182/blood.V66.5.1115.1115.
139. Mirro, J., Kitchingman, G. R., Williams, D. L., Murphy, S. B., Zipf, T. F., and Stass, S. A. (1986) Mixed lineage leukemia: the implications for hematopoietic differentiation, *Blood*, **68**, 597-599, doi: 10.1182/blood.V68.2.597.597.
140. Ziemer-Van Der Poel, S., McCabe, N. R., Gill, H. J., Espinosa, R., Patel, Y., Harden, A., Rubinelli, P., Smith, S. D., Lebeau, M. M., Rowley, I. D., and Diaz, M. O. (1991) Identification of a gene, MLL, that spans the breakpoint in 11q23 translocations associated with human leukemias, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 10735-10739, doi: 10.1073/pnas.88.23.10735.
141. Djabali, M., Selleri, L., Parry, P., Bower, M., Young, B. D., and Evans, G. A. (1992) A trithorax-like gene is interrupted by chromosome 11q23 translocations in acute leukaemias, *Nat. Genet.*, **2**, 113-118, doi: 10.1038/ng1092-113.
142. Marschalek, R. (2011) Mechanisms of leukemogenesis by MLL fusion proteins, *Br. J. Haematol.*, **152**, 141-154, doi: 10.1111/j.1365-2141.2010.08459.x.
143. Super, H. J. G., McCabe, N. R., Thirman, M. J., Larson, R. A., Le Beau, M. M., Pedersen-Bjergaard, J., Philip, P., Diaz, M. O., and Rowley, J. D. (1993) Rearrangements of the MLL gene in therapy-related acute myeloid leukemia in patients previously treated with agents targeting DNA-topoisomerase II, *Blood*, **82**, 3705-3711, doi: 10.1182/blood.V82.12.3705.3705.
144. Felix, C. A. (1998) Secondary leukemias induced by topoisomerase-targeted drugs, *Biochim. Biophys. Acta*, **1400**, 233-255, doi: 10.1016/S0167-4781(98)00139-0.
145. Rao, R. C., and Dou, Y. (2015) Hijacked in cancer: The KMT2 (MLL) family of methyltransferases, *Nat. Rev. Cancer*, **15**, 334-346, doi: 10.1038/nrc3929.
146. Borkhardt, A., Wuchter, C., Viehmann, S., Pils, S., Teigler-Schlegel, A., Stanulla, M., Zimmermann, M., Ludwig, W. D., Janka-Schaub, G., Schrappe, M., and Harbott, J. (2002) Infant acute lymphoblastic leukemia – combined cytogenetic, immunophenotypic and molecular analysis of 77 cases, *Leukemia*, **16**, 1685-1690, doi: 10.1038/sj.leu.2402595.
147. Pieters, R., Schrappe, M., De Lorenzo, P., Hann, I., De Rossi, G., Felice, M., Hovi, L., LeBlanc, T., Szczepanski, T., Ferster, A., Janka, G., Rubnitz, J., Silverman, L., Stary, J., Campbell, M., Li, C. K., Mann, G., Suppiah, R., Biondi, A., Vora, A., and Valsecchi, M. G. (2007) A treatment protocol for infants younger than 1 year with acute lymphoblastic leukaemia (Interfant-99): an observational study and

- a multicentre randomised trial, *Lancet*, **370**, 240-250, doi: 10.1016/S0140-6736(07)61126-X.
148. Creutzig, U., Zimmermann, M., Dworzak, M., Bourquin, J.-P., von Neuhoff, C., Sander, A., Sary, J., and Reinhardt, D. (2012) Additional prognostic impact of specific sites of extramedullary leukemia in pediatric AML with MLL-rearrangements but not in core-binding factor (CBF) AML, *Blood*, **120**, 2621, doi: 10.1182/blood.V120.21.2621.2621.
 149. Marschalek, R. (2016) Systematic classification of mixed-lineage leukemia fusion partners predicts additional cancer pathways, *Ann. Lab. Med.*, **36**, 85-100, doi: 10.3343/alm.2016.36.2.85.
 150. Liu, H., Cheng, E. H. Y., and Hsieh, J. J. D. (2009) MLL fusions: pathways to leukemia, *Cancer Biol. Ther.*, **8**, 1204-1211, doi: 10.4161/cbt.8.13.8924.
 151. Guenther, M. G., Jenner, R. G., Chevalier, B., Nakamura, T., Croce, C. M., Canaani, E., and Young, R. A. (2005) Global and Hox-specific roles for the MLL1 methyltransferase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 8603-8608, doi: 10.1073/pnas.0503072102.
 152. Ayton, P. M., and Cleary, M. L. (2003) Transformation of myeloid progenitors by MLL oncoproteins is dependent on Hoxa7 and Hoxa9, *Genes Dev.*, **17**, 2298-2307, doi: 10.1101/gad.1111603.
 153. Wang, P., Lin, C., Smith, E. R., Guo, H., Sanderson, B. W., Wu, M., Gogol, M., Alexander, T., Seidel, C., Wiedemann, L. M., Ge, K., Krumlauf, R., and Shilatifard, A. (2009) Global analysis of H3K4 methylation defines MLL family member targets and points to a role for MLL1-mediated H3K4 methylation in the regulation of transcriptional initiation by RNA polymerase II, *Mol. Cell. Biol.*, **29**, 6074-6085, doi: 10.1128/MCB.00924-09.
 154. Artinger, E. L., Mishra, B. P., Zaffuto, K. M., Li, B. E., Chung, E. K. Y., Moore, A. W., Chen, Y., Cheng, C., and Ernst, P. (2013) An MLL-dependent network sustains hematopoiesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 12000-12005, doi: 10.1073/pnas.1301278110.
 155. Yu, B. D., Hess, J. L., Horning, S. E., Brown, G. A. J., and Korsmeyer, S. J. (1995) Altered Hox expression and segmental identity in *Mll*-mutant mice, *Nature*, **378**, 505-508, doi: 10.1038/378505a0.
 156. Yagi, H., Deguchi, K., Aono, A., Tani, Y., Kishimoto, T., and Komori, T. (1998) Growth disturbance in fetal liver hematopoiesis of *Mll*-mutant mice, *Blood*, **92**, 108-117, doi: 10.1182/blood.V92.1.108.413k11_108_117.
 157. Ernst, P., Fisher, J. K., Avery, W., Wade, S., Foy, D., and Korsmeyer, S. J. (2004) Definitive hematopoiesis requires the mixed-lineage leukemia gene, *Dev. Cell*, **6**, 437-443, doi: 10.1016/S1534-5807(04)00061-9.
 158. McMahon, K. A., Hiew, S. Y. L., Hadjur, S., Veiga-Fernandes, H., Menzel, U., Price, A. J., Kioussis, D., Williams, O., and Brady, H. J. M. (2007) *Mll* has a critical role in fetal and adult hematopoietic stem cell self-renewal, *Cell Stem Cell*, **1**, 338-345, doi: 10.1016/j.stem.2007.07.002.
 159. García-Alai, M. M., Allen, M. D., Joerger, A. C., and Bycroft, M. (2010) The structure of the FYR domain of transforming growth factor beta regulator 1, *Protein Sci.*, **19**, 1432-1438, doi: 10.1002/pro.404.
 160. Birke, M., Schreiner, S., García-Cuellar, M.-P., Mahr, K., Titgemeyer, F., and Slany, R. K. (2002) The MT domain of the proto-oncoprotein MLL binds to CpG-containing DNA and discriminates against methylation, *Nucleic Acids Res.*, **30**, 958-965, doi: 10.1093/nar/30.4.958.
 161. Allen, M. D., Grummitt, C. G., Hilcenko, C., Min, S. Y., Tonkin, L. M., Johnson, C. M., Freund, S. M., Bycroft, M., and Warren, A. J. (2006) Solution structure of the nonmethyl-CpG-binding CXXC domain of the leukaemia-associated MLL histone methyltransferase, *EMBO J.*, **25**, 4503-4512, doi: 10.1038/sj.emboj.7601340.
 162. Risner, L. E., Kuntimaddi, A., Lokken, A. A., Achille, N. J., Birch, N. W., Schoenfelt, K., Bushweller, J. H., and Zeleznik-Le, N. J. (2013) Functional specificity of CpG DNA-binding CXXC domains in mixed lineage leukemia, *J. Biol. Chem.*, **288**, 29901-29910, doi: 10.1074/jbc.M113.474858.
 163. Muntean, A. G., Tan, J., Sitwala, K., Huang, Y., Bronstein, J., Connelly, J. A., Basrur, V., Elenitoba-Johnson, K. S. J., and Hess, J. L. (2010) The PAF complex synergizes with MLL fusion proteins at HOX loci to promote leukemogenesis, *Cancer Cell*, **17**, 609-621, doi: 10.1016/j.ccr.2010.04.012.
 164. Wang, Z., Song, J., Milne, T. A., Wang, G. G., Li, H., Allis, C. D., and Patel, D. J. (2010) Pro isomerization in MLL1 PHD3-bromo cassette connects H3K4me readout to Cyp33 and HDAC-mediated repression, *Cell*, **141**, 1183-1194, doi: 10.1016/j.cell.2010.05.016.
 165. Chang, P. Y., Hom, R. A., Musselman, C. A., Zhu, L., Kuo, A., Gozani, O., Kutateladze, T. G., and Cleary, M. L. (2010) Binding of the MLL PHD3 finger to histone H3K4me3 is required for MLL-dependent gene transcription, *J. Mol. Biol.*, **400**, 137-144, doi: 10.1016/j.jmb.2010.05.005.
 166. Roloff, T. C., Ropers, H. H., and Nuber, U. A. (2003) Comparative study of methyl-CpG-binding domain proteins, *BMC Genomics*, **4**, 1, doi: 10.1186/1471-2164-4-1.
 167. Yokoyama, A., and Cleary, M. L. (2008) Menin critically links MLL protein with LEDGF on cancer-associated target genes, *Cancer Cell*, **14**, 36-46, doi: 10.1016/j.ccr.2008.05.003.
 168. Hughes, C. M., Rozenblatt-Rosen, O., Milne, T. A., Copeland, T. D., Levine, S. S., Lee, J. C., Hayes, D. N., Shanmugam, K. S., Bhattacharjee, A., Biondi, C. A., Kay, G. F., Hayward, N. K., Hess, J. L., and Meyer-son, M. (2004) Menin associates with a trithorax family histone methyltransferase complex and with the Hoxc8 locus, *Mol. Cell*, **13**, 587-597, doi: 10.1016/S1097-2765(04)00081-4.

169. Slany, R. K. (2016) The molecular mechanics of mixed lineage leukemia, *Oncogene*, **35**, 5215-5223, doi: 10.1038/onc.2016.30.
170. Del Rizzo, P. A., and Trievel, R. C. (2011) Substrate and product specificities of SET domain methyltransferases, *Epigenetics*, **6**, 1059-1067, doi: 10.4161/epi.6.9.16069.
171. Dou, Y., Milne, T. A., Ruthenburg, A. J., Lee, S., Lee, J. W., Verdine, G. L., Allis, C. D., and Roeder, R. G. (2006) Regulation of MLL1 H3K4 methyltransferase activity by its core components, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **13**, 713-719, doi: 10.1038/nsmb1128.
172. Patel, A., Dharmarajan, V., Vought, V. E., and Cosgrove, M. S. (2009) On the mechanism of multiple lysine methylation by the human mixed lineage leukemia protein-1 (MLL1) core complex, *J. Biol. Chem.*, **284**, 24242-24256, doi: 10.1074/jbc.M109.014498.
173. Li, Y., Han, J., Zhang, Y., Cao, F., Liu, Z., Li, S., Wu, J., Hu, C., Wang, Y., Shuai, J., Chen, J., Cao, L., Li, D., Shi, P., Tian, C., Zhang, J., Dou, Y., Li, G., Chen, Y., and Lei, M. (2016) Structural basis for activity regulation of MLL family methyltransferases, *Nature*, **530**, 447-452, doi: 10.1038/nature16952.
174. Lloyd, N. R., and Wuttke, D. S. (2021) Cyp33 binds AU-rich RNA motifs via an extended interface that competitively disrupts the gene repressive Cyp33-MLL1 interaction *in vitro*, *PLoS One*, **16**, 1-18, doi: 10.1371/journal.pone.0237956.
175. Fair, K., Anderson, M., Bulanova, E., Mi, H., Tropschug, M., and Diaz, M. O. (2001) Protein interactions of the MLL PHD fingers modulate MLL target gene regulation in human cells, *Mol. Cell. Biol.*, **21**, 3589-3597, doi: 10.1128/MCB.21.10.3589-3597.2001.
176. Xia, Z. B., Anderson, M., Diaz, M. O., and Zeleznik-Le, N. J. (2003) MLL repression domain interacts with histone deacetylases, the polycomb group proteins HPC2 and BMI-1, and the corepressor C-terminal-binding protein, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 8342-8347, doi: 10.1073/pnas.1436338100.
177. Grow, E. J., and Wysocka, J. (2010) Flipping MLL1's switch one proline at a time, *Cell*, **141**, 1108-1110, doi: 10.1016/j.cell.2010.06.013.
178. Sha, L., Ayoub, A., Cho, U. S., and Dou, Y. (2020) Insights on the regulation of the MLL/SET1 family histone methyltransferases, *Biochim. Biophys. Acta Gene Regul. Mech.*, **1863**, 194561, doi: 10.1016/j.bbagr.2020.194561.
179. Chen, J., Santillan, D. A., Koonce, M., Wei, W., Luo, R., Thirman, M. J., Zeleznik-Le, N. J., and Diaz, M. O. (2008) Loss of MLL PHD finger 3 is necessary for MLL-ENL-induced hematopoietic stem cell immortalization, *Cancer Res.*, **68**, 6199-6207, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-6514.
180. Chan, A. K. N., and Chen, C. W. (2019) Rewiring the epigenetic networks in MLL-rearranged leukemias: Epigenetic dysregulation and pharmacological interventions, *Front. Cell Dev. Biol.*, **7**, 1-15, doi: 10.3389/fcell.2019.00081.
181. Han, Q. L., Zhang, X. L., Ren, P. X., Mei, L. H., Lin, W. H., Wang, L., Cao, Y., Li, K., and Bai, F. (2022) Discovery, evaluation and mechanism study of WDR5-targeted small molecular inhibitors for neuroblastoma, *Acta Pharmacol. Sin.*, **44**, 877-887, doi: 10.1038/s41401-022-00999-z.
182. Wright, R. L., and Vaughan, A. T. M. (2014) A systematic description of MLL fusion gene formation, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, **91**, 283-291, doi: 10.1016/j.critrevonc.2014.03.004.
183. Ross, M. E., Zhou, X., Song, G., Shurtleff, S. A., Girtman, K., Williams, W. K., Liu, H. C., Mahfouz, R., Raimondi, S. C., Lenny, N., Patel, A., and Downing, J. R. (2003) Classification of pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling, *Blood*, **102**, 2951-2959, doi: 10.1182/blood-2003-01-0338.
184. Ferrando, A. A., Armstrong, S. A., Neuberg, D. S., Sallan, S. E., Silverman, L. B., Korsmeyer, S. J., and Look, A. T. (2003) Gene expression signatures in MLL-rearranged T-lineage and B-precursor acute leukemias: dominance of HOX dysregulation, *Blood*, **102**, 262-268, doi: 10.1182/blood-2002-10-3221.
185. Lin, C., Smith, E. R., Takahashi, H., Lai, K. C., Martin-Brown, S., Florens, L., Washburn, M. P., Conaway, J. W., Conaway, R. C., and Shilatifard, A. (2010) AFF4, a component of the ELL/P-TEFb elongation complex and a shared subunit of MLL chimeras, can link transcription elongation to leukemia, *Mol. Cell*, **37**, 429-437, doi: 10.1016/j.molcel.2010.01.026.
186. Yokoyama, A., Lin, M., Naresh, A., Kitabayashi, I., and Cleary, M. L. (2010) A higher-order complex containing AF4 and ENL family proteins with P-TEFb facilitates oncogenic and physiologic MLL-dependent transcription, *Cancer Cell*, **17**, 198-212, doi: 10.1016/j.ccr.2009.12.040.
187. Bitoun, E., Oliver, P. L., and Davies, K. E. (2007) The mixed-lineage leukemia fusion partner AF4 stimulates RNA polymerase II transcriptional elongation and mediates coordinated chromatin remodeling, *Hum. Mol. Genet.*, **16**, 92-106, doi: 10.1093/hmg/ddl444.
188. Mueller, D., García-Cuellar, M. P., Bach, C., Buhl, S., Maethner, E., and Slany, R. K. (2009) Misguided transcriptional elongation causes mixed lineage leukemia, *PLoS Biol.*, **7**, e1000249, doi: 10.1371/journal.pbio.1000249.
189. Nguyen, A. T., and Zhang, Y. (2011) The diverse functions of Dot1 and H3K79 methylation, *Genes Dev.*, **25**, 1345-1358, doi: 10.1101/gad.2057811.
190. Godfrey, L., Crump, N. T., Thorne, R., Lau, I. J., Repapi, E., Dimou, D., Smith, A. L., Harman, J. R., Telenius, J. M., Oudelaar, A. M., Downes, D. J., Vyas, P., Hughes, J. R., and Milne, T. A. (2019) DOT1L inhibition reveals a distinct subset of enhancers dependent on H3K79 methylation, *Nat. Commun.*, **10**, 2803, doi: 10.1038/s41467-019-10844-3.
191. Prange, K. H. M., Mandoli, A., Kuznetsova, T., Wang, S. Y., Sotoca, A. M., Marneth, A. E., Van Der

- Reijden, B. A., Stunnenberg, H. G., and Martens, J. H. A. (2017) MLL-AF9 and MLL-AF4 oncofusion proteins bind a distinct enhancer repertoire and target the RUNX1 program in 11q23 acute myeloid leukemia, *Oncogene*, **36**, 3346–3356, doi: 10.1038/onc.2016.488.
192. Marschalek, R. (2020) The reciprocal world of MLL fusions: A personal view, *Biochim. Biophys. Acta Gene Regul. Mech.*, **1863**, 194547, doi: 10.1016/j.bbagr.2020.194547.
193. Gaussmann, A., Wenger, T., Eberle, I., Bursen, A., Bracharz, S., Herr, I., Dingermann, T., and Marschalek, R. (2007) Combined effects of the two reciprocal t(4;11) fusion proteins MLL-AF4 and AF4-MLL confer resistance to apoptosis, cell cycling capacity and growth transformation, *Oncogene*, **26**, 3352–3363, doi: 10.1038/sj.onc.1210125.
194. Eberle, I., Pless, B., Braun, M., Dingermann, T., and Marschalek, R. (2010) Transcriptional properties of human NANOG1 and NANOG2 in acute leukemic cells, *Nucleic Acids Res.*, **38**, 5384–5395, doi: 10.1093/nar/gkq307.
195. Wilhelm, A., and Marschalek, R. (2021) The role of reciprocal fusions in MLL-r acute leukemia: studying the chromosomal translocation t(4;11), *Oncogene*, **40**, 6093–6102, doi: 10.1038/s41388-021-02001-2.
196. Ferrando, A. A., and López-Otín, C. (2017) Clonal evolution in leukemia, *Nat. Med.*, **23**, 1135–1145, doi: 10.1038/nm.4410.
197. Greaves, M., and Maley, C. C. (2012) Clonal evolution in cancer, *Nature*, **481**, 306–313, doi: 10.1038/nature10762.
198. Anoun, S., Lamchahab, M., Qachouh, M., Benchekroun, S., and Quessar, A. (2013) A case of acute myeloid leukemia caused by low dose methotrexate used to treat a rheumatoid arthritis patient, *Iran. J. Blood Cancer*, **5**, 25–28.
199. Maddalo, D., Manchado, E., Concepcion, C. P., Bonetti, C., Vidigal, J. A., Han, Y. C., Ogrodowski, P., Crippa, A., Rekhtman, N., Stanchina, E. De, Lowe, S. W., and Ventura, A. (2014) *In vivo* engineering of oncogenic chromosomal rearrangements with the CRISPR/Cas9 system, *Nature*, **516**, 423–428, doi: 10.1038/nature13902.
200. Torres, R., Martin, M. C., Garcia, A., Cigudosa, J. C., Ramirez, J. C., and Rodriguez-Perales, S. (2014) Engineering human tumour-associated chromosomal translocations with the RNA-guided CRISPR-Cas9 system, *Nat. Commun.*, **5**, 1–8, doi: 10.1038/ncomms4964.
201. Sall, F. B., Shmakova, A., Karpukhina, A., Tsfasman, T., Lomov, N., Canoy, R. J., Boutboul, D., Oksenhendler, E., Toure, A. O., Lipinski, M., Wiels, J., Germini, D., and Vassetzky, Y. (2023) Epstein–Barr virus reactivation induces MYC-IGH spatial proximity and t(8;14) in B cells, *J. Med. Virol.*, **95**, e28633, doi: 10.1002/jmv.28633.

MECHANISMS FOR THE DEVELOPMENT OF THERAPY-RELATED LEUKAEMIA CAUSED BY TOPOISOMERASE INHIBITORS

Review

N. A. Lomov^{1*}, V. S. Viushkov¹, and M. A. Rubtsov^{1,2}

¹ Department of Molecular Biology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, 119234 Moscow, Russia; e-mail: lomov@mail.bio.msu.ru

² Department of Biochemistry, Center for Industrial Technologies and Entrepreneurship I. M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), 119435 Moscow, Russia

Leukemia is a blood cancer that originates in the blood and bone marrow. Therapy-related leukemia is a leukemia associated with prior chemotherapy. Cancer therapy with DNA-topoisomerase II inhibitors is one of the most effective among chemotherapies. However, its side effect can be the development of secondary leukemia, characterized by chromosomal rearrangements involving the *AML1* or *MLL* gene. The set of recurrent translocations in such leukemia differs from the set of chromosomal rearrangements in other neoplasia. We review the factors that drive the translocations upon treatment of cells with DNA-topoisomerase inhibitors. Such factors primarily include the mobility of double-strand DNA ends prior to translocation and the gain of functions of the fusion proteins that are formed in the cell as a result of translocation.

Keywords: leukemia, translocations; fusion proteins, DNA topoisomerase II inhibitors

ТИОСУЛЬФИНАТЫ: ЦИТОТОКСИЧЕСКАЯ И ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТИ

Обзор

© 2023 В.В. Куликова*, Е.А. Морозова, В.С. Коваль, П.Н. Сольев,
Т.В. Демидкина, С.В. Ревтович

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН,
119991 Москва, Россия; электронная почта: vitviku@yandex.ru

Поступила в редакцию 25.01.2023

После доработки 12.05.2023

Принята к публикации 12.05.2023

Фармакологические свойства некоторых природных соединений делают их привлекательными для лечения онкологических заболеваний. Серосодержащие тиосульфиды, обнаруженные в растениях рода *Allium*, с давних пор известны как соединения с различными терапевтическими свойствами, в том числе противоопухолевыми. На протяжении последних лет активно изучалось влияние тиосульфидов на различные стадии канцерогенеза. Исследования *in vitro* и *in vivo* показали, что тиосульфиды ингибируют пролиферацию раковых клеток, а также индуцируют апоптоз. Цель настоящего обзора – обобщить современные данные о цитотоксических свойствах природных и синтетических тиосульфидов и их применении в терапии рака. Обсуждаются механизмы противоопухолевого действия и молекулярные мишени этих перспективных соединений. Значительная часть обзора посвящена рассмотрению новой стратегии для лечения онкологических заболеваний – использованию метода направленной ферментной пролекарственной терапии с возможностью получения противоопухолевых тиосульфидов *in situ*.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: природные и синтетические тиосульфиды, цитостатическая активность, противоопухолевая активность, направленная ферментная пролекарственная терапия.

DOI: 10.31857/S0320972523070059, EDN: FVUZLD

ВВЕДЕНИЕ

Природные сероорганические соединения известны своими антиоксидантными, противовоспалительными и противоопухолевыми свойствами [1]. Эти соединения в изобилии содержатся в спарже, чесноке, луке и крестоцветных овощах. Сульфоксиды S-алк(ен)ил-L-цистеина являются предшественниками биологически активных тиосульфидов общей формулы $R^1SS(O)R^2$, присутствующих в гомогенатах растений рода *Allium* [2]. Аллицин – самый известный тиосульфид, преобладающий в гомогенатах чеснока. Многочисленные лечебные свойства чеснока, знакомые человечеству с древнейших времён, во многом обусловлены аллицином и продуктами его превращений [3, 4]. Аллицин является высоко-

реакционноспособным соединением, которое взаимодействует с доступными остатками цистеина в белках и низкомолекулярных тиолах, включая внутриклеточный глутатион у эукариот и грамотрицательных бактерий, а также бацитиол у грамположительных бактерий. В высоких дозах у эукариот аллицин может индуцировать апоптоз или некроз, тогда как его более низкие, биосовместимые концентрации могут модулировать активность окислительно-восстановительных белков и влиять на клеточную сигнализацию [5]. Так как аллицин имеет множество клеточных мишеней в клетках человека и способен ингибировать клеточную пролиферацию, ангиогенез и метастатический процесс, увеличивать экспрессию генов-супрессоров опухоли, индуцировать апоптоз и модулировать другие генетические пути,

Принятые сокращения: АМТС – аллилметилтиосульфид; ДБТС – дибутилтиосульфид; ДМТС – диметилтиосульфид; ДПТС – дипропилтиосульфид; ДЭТС – диэтилтиосульфид; МГЛ – метионин-γ-лиаза.

* Адресат для корреспонденции.

весьма перспективны исследования возможностей применения аллицина в качестве противоопухолевого агента [6].

Аналоги аллицина, симметричные и несимметричные тиосульфиды, содержащие предельные и непредельные заместители, также присутствуют в экстракте чеснока [7]. Тиосульфиды с предельными или ароматическими заместителями химически более устойчивы, чем аллицин [8–10], обладают схожим с ним механизмом действия и являются перспективными кандидатами в лекарственные средства для терапии злокачественных новообразований. Аллицин и его аналоги продемонстрировали противораковую активность в отношении различных типов опухолей (саркома [11], лейкемия [12–14], меланома [15], лимфома [16], рак молочной железы [17–22], яичников [23–25], печени [18, 19], лёгких [15, 19, 26], желудка [27], кишечника [15, 20, 28, 29], простаты [18, 29–31]) (табл. 1). В большинстве опубликованных обзоров, посвящённых противораковым свойствам чеснока, в основном описаны цитотоксические и терапевтические свойства его экстрактов [32, 33], а также продуктов реакции β -элиминирования сульфоксида S-аллил-L-цистеина — аллицина и продуктов его дальнейших превращений (диаллилсульфида, диаллилдисульфида, диаллилтрисульфида и аджоена) [6, 34–36]. В отличие от свойств аллицина, цитотоксические свойства его аналогов исследованы мало. В настоящем обзоре собраны и проанализированы данные о противоопухолевом потенциале природных и синтетических тиосульфидов, являющихся более перспективными по сравнению с аллицином ввиду их большей стабильности.

ПРИРОДНЫЕ ТИОСУЛЬФИДАТЫ

Аллицин и другие природные алкилзамещённые тиосульфиды образуются при разрушении клеток растений рода *Allium* в результате ферментативной реакции расщепления небелковых аминокислот, сульфоксидов S-замещённого L-цистеина, катализируемой пиридоксаль-5'-фосфат-зависимой аллииназой (КФ 4.4.1.4, рис. 1) [7, 8].

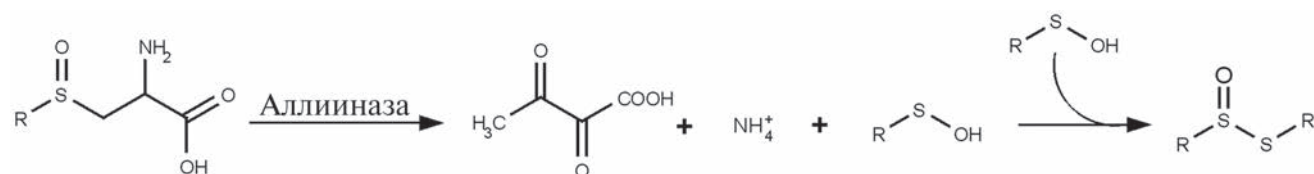


Рис. 1. Схема синтеза тиосульфидов в клетках растений (R = аллил-, метил-, пропил-, бутил-, пропенил-)

Исследования биологических свойств аллицина начались с работ С. J. Cavallito et al., в которых были исследованы его антимикробные свойства [37], определена его структура и способность окислять цистеин [38]. Было установлено, что аллицин окисляет сульфгидрильные группы нескольких ферментов и нейтрализует гидроксильные радикалы (рис. 2) [39]. Всестороннее исследование действия аллицина на протеом клеток Jurkat [40] показало, что аллицин окисляет 332 белка протеома, и выявило влияние окисления сульфгидрильных групп на основные клеточные функции выбранных белков, многие из которых могут быть мишенями для терапии рака.

Бактериальная β -глюкуронидаза (КФ 3.2.1.31) участвует в канцерогенезе, продукты расщепления её субстратов являются канцерогенными [41]. В работах Takada et al. и Morita et al. [42, 43] было показано, что диметилтиосульфид (ДМТС) необратимо ингибировал β -глюкуронидазу ($\text{IC}_{50} = 3,6$ мкМ) путём модификации её свободных сульфгидрильных групп, таким образом уменьшая вызванную канцерогенами опухоль толстого кишечника.

Многочисленные исследования механизма действия аллицина на раковые клетки показали, что он тормозит клеточный цикл в фазе G2/M и индуцирует апоптоз [44] (рис. 3). Кроме того, аллицин, как было показано на клетках рака желудка SGC-7901, ингибирует активность теломеразы, которая реактивируется во множестве опухолей [27].

Впервые противоопухолевая активность четырёх диалкилтиосульфидов — диметил-, диэтил-, дипропил-, дибутилтиосульфидов (ДМТС, ДЭТС, ДПТС, ДБТС) — была показана в 1957 г. [11]. В работе исследовали влияние бинарной смеси аллииназы + субстрат (сульфоксид S-этил-L-цистеина) и четырёх индивидуальных тиосульфидов на рост привитой мышам опухоли саркомы 180. Предварительная инкубация клеток саркомы *in vitro* либо с бинарной смесью, либо с тиосульфидами перед трансплантацией мышам приводила к ингибированию роста опухолей, и далее в течение 300 (бинарная смесь) и 180 (тиосульфиды) дней не наблюдалось смертности животных. Внутривенные инъекции тиосульфидов

Таблица 1. Цитотоксическая и противоопухолевая активности тиосульфидов

Тиосульфид (R ¹ SS(O)R ²)	Источник	Клеточная линия	Результат	<i>In vitro</i> / <i>in vivo</i>	Ссылка
R ¹ = R ² = Me, Et, Pr, Bu	синтез	асцитная саркома 180	полное ингибирование развития асцитов	<i>in vivo</i>	[11]
R ¹ = R ² = Et	синтез	саркома 180 лимфосаркома Murphy–Sturm	ингибирование роста саркомы на 60%, роста лимфосаркомы на 40%	<i>in vivo</i>	[11]
R ¹ = R ² = Me, Pr	синтез	HL-60 (FAB M2), NB4 (FAB M3), U937 и MonoMac-6 (FAB M5)	ингибирование роста лейкозных клеток	<i>in vitro</i>	[12]
R ¹ = R ² = Me; R ¹ = аллил, R ² = Me	выделены из <i>Allium tuberosum</i> L.	MCF-7, SW480, HepG2, LNCap.FGC	цитотоксический эффект, апоптоз для клеток MCF-7	<i>in vitro</i>	[18]
R ¹ = R ² = Me; R ¹ = аллил, R ² = Me	выделены из <i>A. tuberosum</i> L.	асцитная саркома 180	увеличение продолжительности жизни животных	<i>in vivo</i>	[18]
R ¹ = R ² = Me; R ¹ = аллил, R ² = Me	выделены из <i>A. tuberosum</i> L.	RC-58T/h/SA#4 DU145	торможение роста клеток по механизму апоптоза	<i>in vitro</i>	[30]
R ¹ = R ² = Me; R ¹ = аллил, R ² = Me; экстракт из <i>A. tuberosum</i> L.	выделены из <i>A. tuberosum</i> L.	HT-29	каспаза-зависимый и каспаза-независимый пути апоптоза клеток	<i>in vitro</i>	[28]
R ¹ = R ² = Me; R ¹ = аллил, R ² = Me	выделены из <i>A. tuberosum</i> L.	PC-3	каспаза-зависимый и каспаза-независимый пути апоптоза клеток	<i>in vitro</i>	[31]
R ¹ = R ² = 4-MeOPh	синтез	MCF-7/Dx	остановка клеточного цикла в фазе G2/M, апоптоз, ингибирование митохондриального дыхания клеток	<i>in vitro</i>	[17]
R ¹ = R ² = 4-MeOBn	синтез	MDA-MB-468, MCF-7	каспаза-зависимый апоптоз	<i>in vitro</i>	[21]
R ¹ = R ² = Et	ферментативная реакция	асцитная саркома 180	полное ингибирование роста опухоли	<i>in vivo</i>	[11]
R ¹ = R ² = аллил	ферментативная реакция	ES-2	ингибирование роста и пролиферации опухоли	<i>in vivo</i>	[24]
R ¹ = R ² = аллил	ферментативная реакция	N87, CB2	ингибирование роста и пролиферации опухоли	<i>in vitro</i> , <i>in vivo</i>	[23]
R ¹ = R ² = аллил	ферментативная реакция	хронический лимфоцитарный лейкоз	апоптоз, ингибирование роста опухоли	<i>in vitro</i> , <i>in vivo</i>	[14]
R ¹ = R ² = аллил, Me, Et, Pr	ферментативная реакция	MCF-7, SCOV-3, SW-620	цитотоксический эффект	<i>in vitro</i>	[25]
R ¹ = R ² = аллил, Me, Et, Pr	ферментативная реакция	MCF-7, SKBR3, MDA-MB-231, T-47D	цитотоксический эффект, ингибирование роста опухоли	<i>in vitro</i> , <i>in vivo</i>	[22]
R ¹ = R ² = Pr	ферментативная реакция	HT-29, COLO205, HCT116, Panc1, MIA-PaCa2, 22Rv1, DU-145, PC3, SW-620	цитотоксический эффект, ингибирование роста опухоли	<i>in vitro</i> , <i>in vivo</i>	[29]

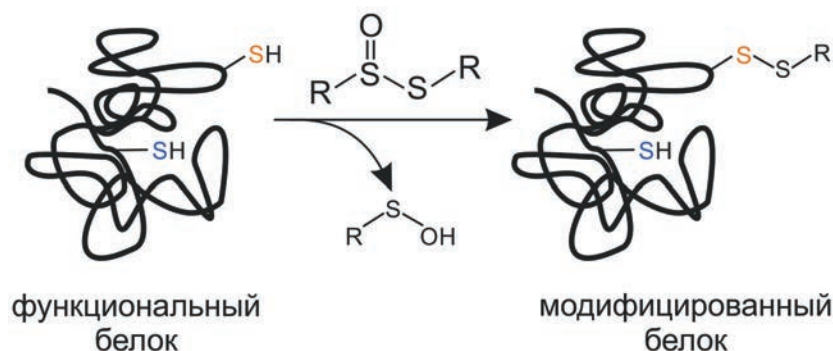


Рис. 2. Влияние тиосульфатов на белки (адаптировано из работы Borlinghaus et al. [3]). Доступный для атаки остаток цистеина (обозначен оранжевым) реагирует с тиосульфатами посредством реакции дисульфидного обмена. Остаток цистеина, доступ к которому стерически заблокирован (обозначен синим цветом), с тиосульфатами не реагирует

мышам, предварительно привитым клетками саркомы, задерживали возникновение злокачественных опухолей и в некоторых случаях полностью предотвращали их образование и гибель мышей. Было исследовано влияние ДЭТС на рост саркомы 180, привитой мышам, и лимфосаркомы Murphy-Sturm, привитой крысам. После 7-дневного введения ДЭТС и двухнедельного наблюдения область саркомы уменьшилась на 60%, область лимфосаркомы — на 40%. В более поздних исследованиях на мышах с привитой асцитной опухолью саркомы 180 введение ДМТС и аллилметилтиосульфата (АМТС) в дозе 50 мг/кг увеличивало продолжительность жизни животных до 29 дней, для контрольной группы продолжительность жизни составляла 16,8 дней [18].

Исследование действия трёх тиосульфатов — аллицина, ДМТС и ДПТС — на тромбоциты [45] показало, что предельные тиосульфаты, как и аллицин, дозозависимо ингибируют агрегацию тромбоцитов со значениями IC_{50} , равными 15, 19 и 9 мкМ для аллицина, ДМТС и ДПТС соответственно. Тиосульфаты подавляли выпадение микрочастиц и втягивание тромба и дальнейшие события, индуцированные агрегацией, такие как активация кальпаина. Кальпаин участвует в инвазии опухолевых клеток и их метастазировании [46]. Таким образом, в данной работе (после долгого перерыва в исследовании биологической активности тиосульфатов, начатом в работе Weisberger et al. [11]) показана перспективность исследования ДМТС и ДПТС как потенциальных цитотоксических и противоопухолевых средств. В продолжение этих исследований было установлено, что ДМТС и ДПТС взаимодействуют с сульфгидрильными группами как на поверхности тромбоцитов, так и внутри клетки, окисляя внутриклеточные белки, в том числе кальпаин, и исследованы реакции тромбоцитов (сигналы Ca^{2+} , ре-

акция высвобождения и состояние активации интегрин) на модификацию их поверхностных SH-групп [47]. В работе Merhi et al. [12] было установлено, что ДМТС и ДПТС, но не аллицин, влияли на злокачественные миелоидные клеточные линии человека HL-60 (FAB M2), NB4 (FAB M3), U937 и MonoMac-6 (FAB M5), воздействуя на рост клеток, дифференцировку и секрецию факторов, участвующих в опухолевых процессах. Обработка лейкозных клеточных линий этими двумя тиосульфатами приводила к индуцированию созревания макрофагов, обладающих противоопухолевой активностью, и ингибированию уровней секреции матриксной металлопротеиназы-9 (MMP-9) и фактора некроза опухоли (TNF- α), которые могут играть важную роль в прогрессировании рака, влияя на ангиогенез опухоли, её рост и/или метастазирование. Авторы полагают, что отсутствие влияния аллицина объясняется его неустойчивостью. Исследуемые в работе тиосульфаты использовались как водные растворы, однако эти соединения более устойчивы в органических растворителях [17]. Вполне вероятно, что объяснение авторов об отсутствии влияния аллицина на лейкозные клетки из-за неустойчивости при использовании его водного раствора правомерно. В то же время другие авторы показали, что в клетках HL60 и U937 аллицин (растворитель в работе не указан) индуцировал ингибирование роста и вызывал апоптотические события, такие как блеббинг, деполяризацию митохондриальной мембраны, высвобождение цитохрома c в цитозоль, активацию каспазы 9 и каспазы 3 и фрагментацию ДНК [13].

Цитотоксическая и противоопухолевая активности тиосульфатов, выделенных из *A. tuberosum* L., исследовались в нескольких работах. АМТС и ДМТС проявили дозо- и времязависимый цитотоксический эффект на клеточных

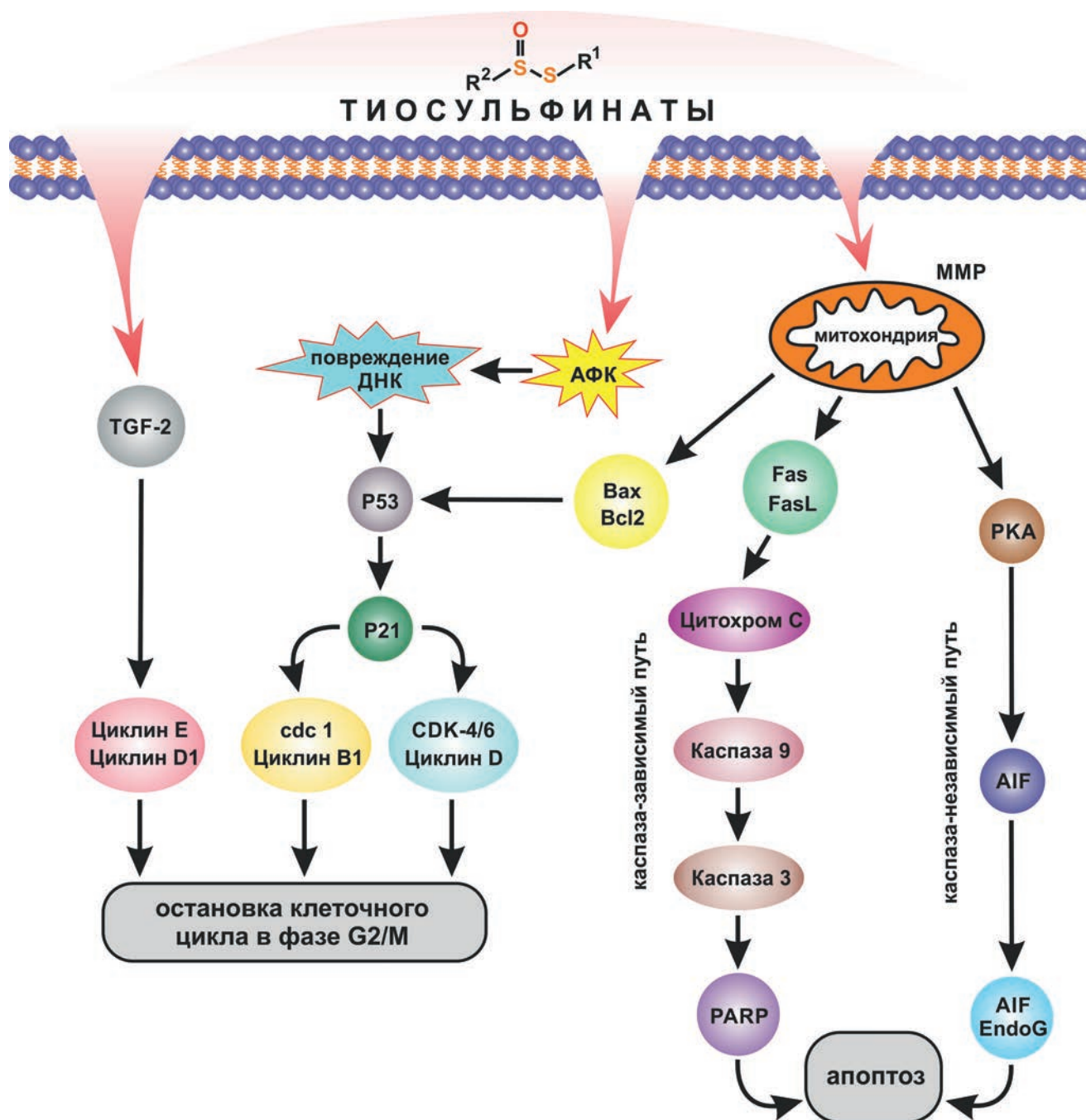


Рис. 3. Цитостатическое действие тиосульфидов на опухолевые клетки. PKA – протеинкиназа A; AIF – фактор, индуцирующий апоптоз; Bax – проапоптотический белок; Bcl2 – антиапоптотический белок; АФК – активные формы кислорода; PARP – поли(АРД-рибоза)-полимераза; TGF-2 – трансформирующий фактор роста; EndoG – эндонуклеаза G; Fas, FasL – белки семейства TNF (фактора некроза опухоли); ММР – митохондриальный мембранный потенциал

линиях рака молочной железы MCF-7, толстого кишечника SW480, гепатоцеллюлярной карциномы HepG2, андроген-положительных и андроген-отрицательных клетках простаты человека LNCaP-FGC, RC-58T/h/SA#4, PC-3, DU145 (табл. 2) [18, 30, 31]. AMTC оказался наилучшим ингибитором.

Тиосульфиды снижали количество жизнеспособных клеток в зависимости от дозы и

времени и останавливали рост клеток в поздней фазе G1. Наиболее чувствительными были клетки RC-58T/h/SA#4. После обработки клеток смесью тиосульфидов наблюдали фрагментацию ядер и апоптотические тельца. Исследовав морфологические изменения клеток, фрагментацию ДНК, состояние белка PARP, экспрессия которого специфически повышается в опухолевых клетках, претерпевающих

Таблица 2. Цитотоксичность тиосульфидов из *A. tuberosum* L.

Линии клеток	IC ₅₀ (мкг/мл)	
	ДМТС	АМТС
MCF-7	17,05 (155,0 мкМ)	7,51 (55,22 мкМ)
SW480	16,28 (148,0 мкМ)	7,17 (52,75 мкМ)
HepG2	20,2 (183,64 мкМ)	11,81 (86,83 мкМ)
LNCaP-FGC	11,24 (102,1 мкМ)	4,04 (29,71 мкМ)
RC-58T/h/SA#4	10,56 (96,06 мкМ)	3,52 (25,28 мкМ)
PC-3	18,22 (165,6 мкМ)	8,56 (62,94 мкМ)
DU145	20,2 (183,63 мкМ)	11,67 (85,80 мкМ)

апоптоз, активности каспаз и другие признаки, характерные для апоптоза, авторы пришли к выводу, что апоптоз, индуцируемый тиосульфидами, связан с активацией каспазы 3, 8 и 9. Они также установили, что тиосульфиды стимулировали расщепление белка Bid, который активирует белок Бах, запускающий митохондриальный путь апоптоза. Bid расщеплялся каспазой 8, что приводило к активации каспазы 9 и каспазы 3. Тиосульфиды снижали экспрессию антиапоптотического белка Bcl-2, блокирующего повышение проницаемости мембраны митохондрий, и повышали экспрессию проапоптотического белка Бах, который ускоряет запрограммированную гибель клеток путём связывания репрессора апоптоза Bcl-2. Эти данные указывали на то, что индукция апоптоза у обработанных смесью двух тиосульфидов клеток может быть связана с каспаза-зависимым каскадом, который включает активацию митохондриального пути апоптоза, инициируемого ингибированием белка Bcl-2 и активацией Бах. Тиосульфиды повышали экспрессию AIF (фактора, индуцирующего апоптоз) и его транслокацию в ядра. Митохондриальный флавопротеин AIF, действующий независимо от каспаз, индуцирует апоптоз, перемещаясь в ядро после начала апоптоза. Суммируя все данные, авторы сделали заключение, что тиосульфиды тормозили рост клеток путём запуска апоптоза, который

может протекать как по каспаза-зависимому, так и по каспаза-независимому механизму (рис. 3).

Каспаза-зависимый и каспаза-независимый пути апоптоза клеток HT-29 колоректального рака человека под действием тиосульфидов исследованы в работе Lee et al. [28]. Смесью ДМТС и АМТС индуцировала гибель клеток HT-29 в зависимости от дозы и времени. Обработка клеток смесью активировала каспазы 3, 8 и 9 и стимулировала расщепление белка Bid. Авторы установили, что тиосульфиды снижали экспрессию антиапоптотического белка Bcl-2 и повышали экспрессию проапоптотического белка Бах. Они также увеличивали экспрессию белка AIF, независимого от каспазы фактора митохондриального апоптоза, и индуцировали фрагментацию ДНК и конденсацию хроматина в клетках HT-29.

ЦИТОТОКСИЧЕСКАЯ И ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТИ СИНТЕТИЧЕСКИХ ТИОСУЛЬФИДОВ

Как отмечалось выше, аналоги аллицина, содержащие вместо непредельных заместителей насыщенные углеводородные или ароматические радикалы, более устойчивы, чем сам аллицин. Установленные цитотоксические и противоопухолевые свойства природных тиосульфидов стимулируют синтез и исследование биологической активности их аналогов.

В работе Roseblade et al. [17] было синтезировано 22 тиосульфида и проведено исследование их стабильности и антипролиферативной активности на клетках MCF-7, чувствительных ко многим лекарственным средствам, и клетках MCF-7/Dx, обладающих множественной лекарственной устойчивостью. Все тиосульфиды оказались более стабильными, чем аллицин. Использование полярных растворителей значительно увеличивало их стабильность. За исключением единственного соединения, тиосульфиды не имели каких-либо рисков токсичности и не обладали мутагенными, онкогенными или раздражающими эффектами. Было проведено исследование влияния тиосульфидов на гибель клеток, апоптоз, ход клеточного цикла и биоэнергетическую функцию митохондрий.

Симметричные и асимметричные тиосульфиды, содержащие преимущественно ароматические фрагменты, проявили большую антипролиферативную активность в отношении клеток MCF-7 и MCF-7/Dx, чем аллицин (табл. 3). Эти соединения также были эффективны по отношению к клеткам со множе-

Таблица 3. Цитотоксичность тиосульфидов вида $R^1SS(O)R^2$

Соединение	IC ₅₀ (мкМ)	
	MCF-7/Dx	MCF-7
Аллицин	41,23	-
R ¹ = Bu, R ² = Bu	33,74	> 50
R ¹ = 4-MePh, R ² = Et	35,99	> 50
R ¹ = 4-MePh, R ² = Pr	38,11	> 50
R ¹ = 4-MeO-Ph, R ² = 4-MePh	40,77	> 50
R ¹ = 4-MeO-Ph, R ² = 4-MeO-Ph	18,54	46,50
R ¹ = 4-MeO-Ph, R ² = Et	28,97	> 50
R ¹ = 4-MeO-Ph, R ² = Bu	28,97	> 50
R ¹ = 4-MeO-Ph, R ² = t-Bu	45,54	> 50
R ¹ = 4-MeO-Ph, R ² = гексил	41,11	> 50
R ¹ = 4-MeO-Ph, R ² = циклогексил	28,75	> 50
R ¹ = 4-MeO-Ph, R ² = 4-t-BuBn	48,61	> 50

ственной лекарственной устойчивостью. Среди них симметричный тиосульфид, содержащий 4-метоксифенильные группы ($R^1SS(O)R^2$, $R^1 = R^2 = 4\text{-MeO-Ph}$), который проявил наибольшую цитотоксическую активность как на клетках MCF-7/Dx, так и на клетках MCF-7. Исследования влияния этого соединения на клеточную морфологию и стадии цикла клеток MCF-7/Dx показали, что тиосульфид изменил клеточную морфологию и остановил клеточный цикл в фазе G2/M. Соединение дозозависимо индуцировало апоптоз и ингибировало митохондриальное дыхание клеток в состоянии покоя и при стрессе. Множественная лекарственная устойчивость к противоопухолевым соединениям является серьёзной проблемой при лечении онкологических заболеваний, и полученные в данной работе результаты демонстрируют, что тиосульфиды перспективны как новые средства против химиорезистентных опухолей.

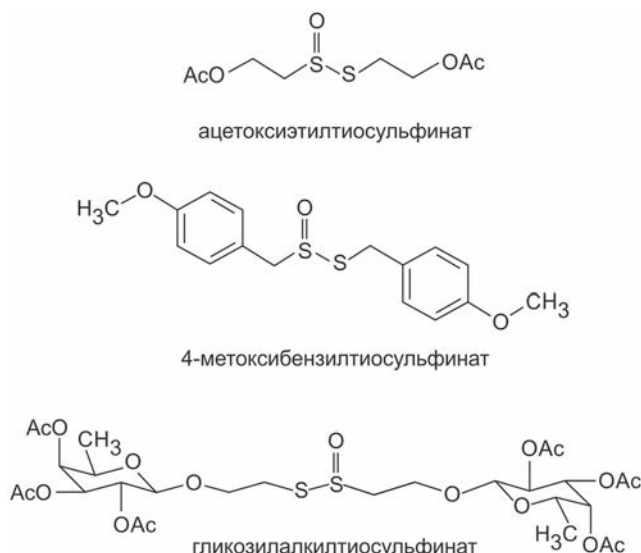


Рис. 4. Синтетические аналоги аллицина с антипролиферативными свойствами

Из 19 синтезированных в работе Bhaumik et al. [21] симметричных алкил/арил/гликозилалкилтиосульфидов три соединения ($R =$ = ацетоксиэтил-, 4-метоксибензил-, гликозилалкил-) (рис. 4) показали наибольшую эффективность в ингибировании пролиферации клеток рака молочной железы MDA-MB-468 со значениями IC₅₀, равными 18,87, 11,34 и 22,38 мкМ соответственно. Аналогичная эффективность этих соединений наблюдалась и на клетках MCF-7 со значениями IC₅₀, равными 22,36, 13,01 и 25,92 мкМ соответственно.

В клетках MDA-MB-468 и MCF-7 тиосульфид с 4-метоксибензильным заместителем вызывал образование активных форм кислорода и изменения в проницаемости митохондрий. Для двух клеточных линий наблюдали увеличение экспрессии проапоптотического белка Вах, снижение экспрессии антиапоптотического белка Bcl-2, блокирующего повышение проницаемости мембраны митохондрий, активацию каспазы 3 и индуцированные каспазой повреждения ДНК, что свидетельствует об апоптозе клеток MDA-MB-468 и MCF-7.

В работе Block et al. [48] были синтезированы фторированные аналоги серосодержащих соединений чеснока, в том числе и дифтораллицин, и исследовано их влияние на ангиогенез и тромбоз в сравнении с нефторированными соединениями. Антиангиогенная эффективность фторированных соединений исследовалась с использованием модели хориоаллантоисной мембраны цыплят и индуцированной матригелем мышинной модели. Кроме того, в цельной крови человека исследовали влияние тех же соединений на агрегацию

тромбоцитов и динамику тромбоцитарно-фибринового сгустка. Дифтораллицин, как и другие фторированные аналоги, эффективно ингибировал ангиогенез, опосредованный либо фактором роста эндотелия сосудов, либо основным фактором роста фибробластов в хориоаллантоисной мембране цыплят или в матриксной модели. Дифтораллицин продемонстрировал большее ингибирование по сравнению с другими соединениями. Смертности эмбрионов при этом не наблюдалось. Аллицин и дифтораллицин показали сравнимый и больший по сравнению с другими соединениями антитромбоцитарный эффект. Однако антикоагулянтная активность дифтораллицина была больше как по сравнению с другими соединениями, так и с аллицином. Большую по сравнению с аллицином биологическую активность дифтораллицина авторы объясняют тем, что введение фтора увеличило электрофильность атома серы, т.е. способность соединения тиолировать сульфгидрильные группы. Кроме того, введение атома фтора в молекулу аллицина, как полагают авторы, должно было приводить к изменению липофильности соединения и его способности проникать через мембрану. Ангиогенез играет важную роль в росте опухоли и метастазировании. Поэтому дифтораллицин может быть новым противоопухолевым препаратом, подлежащим, в отличие от аллицина, патентованию. Следует отметить, что в работе установлена неизвестная ранее для аллицина антикоагулянтная активность, что может стимулировать исследование других тиосульфидов как антикоагулянтов.

ТИОСУЛЬФИНАТЫ В ФЕРМЕНТАТИВНОЙ ПРОЛЕКАРСТВЕННОЙ ТЕРАПИИ

Новым подходом для лечения онкологических заболеваний является направленная ферментная пролекарственная терапия опухолей. Этот подход включает два этапа. На первом выбранный фермент или его ген доставляется к опухолевым клеткам. На втором этапе нетоксичный субстрат (пролекарство) ферментативно преобразуется в токсичное средство только в области опухоли. Это позволяет повысить селективность действия цитотоксического вещества на опухолевые клетки и снизить его токсичность для организма в целом. Впервые такой подход был применён в 1974 г. [49] и интенсивно развивается в настоящее время.

Первым тиосульфидом, полученным *in situ* в составе фармакологической пары пири-

доксаль-5'-фосфат-зависимая аллииназа (КФ 4.4.1.4) + аллиин, был аллицин. В работе Miron et al. [23] был получен ковалентный конъюгат аллииназы с моноклональным антителом к рецептору эпидермального фактора роста человека (ErbB2). Конъюгат связывался с опухолевыми клетками-мишенями (клеточная линия аденокарциномы желудка человека N87, экспрессирующая рецепторы ErbB2, и клеточная линия рака яичников китайского хомяка СВ2, трансфицированная экспрессионным вектором млекопитающих ErbB2). После добавления к клеткам аллиина наблюдалось эффективное ингибирование их роста. В опытах *in vivo* на ксенографтах N87, привитых мышам, также была продемонстрирована высокая противоопухолевая активность аллицина, образующегося *in situ* при введении животным этого конъюгата и аллиина. При этом субстрат и продукт реакции не оказывали негативного действия на здоровые ткани животных. Авторы объясняют этот эффект отсутствием токсичности у аллиина и высоким уровнем клиренса аллицина.

В работе Arditti et al. [14] был получен конъюгат аллииназы с моноклональным антителом ритуксимабом, которое распознаёт Т-клеточный поверхностный антиген T11/Leu-5 (CD20). При добавлении полученного конъюгата и аллиина к злокачественным В-клеткам, экспрессирующим в различных количествах CD20 (клетки В-хронического лимфолейкоза и клетки В-клеточных лимфом), образовавшийся *in situ* аллицин приводил к гибели опухолевых В-клеток посредством апоптоза. На радиационной химере человек-мышь с привитыми животным CD20⁺ опухолевыми клетками В-хронического лимфолейкоза/мантийноклеточной лимфомы/ВЭБ-трансформированных В-клеток было показано, что однократное введение конъюгата с последующим многократным введением аллиина приводит к значительному снижению количества опухолевых клеток в образцах клеток брюшины, взятых через 24 ч после последнего введения субстрата.

Для направленной доставки аллииназы к поверхности опухолевых клеток с гиперэкспрессией рецепторов эстрогена (ER⁺) были получены конъюгаты аллииназы с природным фитоэстрогеном дайдзеином (Dz), имеющим химически сходную с эстрадиолом структуру [24]. Конъюгат специфически связывался с клетками рака яичников *in vitro* и при добавлении аллиина эффективно продуцировал цитотоксические молекулы аллицина, которые убивали раковые клетки. Исследование биораспределения меченого европием конъюгата

аллииназа-дайдзеин на моделях ксенографтов ES-2 у мышей показало его преимущественное накопление в опухолях по сравнению с другими тканями. Эффективность конъюгата в присутствии аллиина также была доказана *in vivo* при лечении мышей с привитой опухолью рака яичника [24]. В течение первых 12 дней в терапевтической группе наблюдалось торможение роста опухолей по сравнению с группой животных, принимавших плацебо. Гистологическое исследование органов и тканей не выявило каких-либо дополнительных очагов карциномы или признаков токсичности препаратов.

В работе Chhabria et al. [50] показано, что конъюгат аллииназы с моноклональным антителом к опухолевому маркеру рака поджелудочной железы CA19-9 связывается с клетками рака поджелудочной железы MIA PaCa-2, и при добавлении аллиина локализованная в раковых клетках аллииназа вырабатывает аллицин, который индуцирует апоптоз посредством различных эпигенетических модификаций, в частности, активации экспрессии каспазы 3, фрагментации ДНК, остановки клеточного цикла и экспрессии ингибитора циклинзависимой киназы p21^{WAF1/Cip1}, а также образования активных форм кислорода и истощения запаса глутатиона. Специфичность противоопухолевой активности аллицина, генерируемого *in situ*, была продемонстрирована на нескольких типах клеток с использованием новой интегрированной дискретной системы совместного культивирования нескольких органов (IdMOC). Аллицин оказывал дозозависимое цитотоксическое действие на клеточную линию MIA PaCa-2, тогда как для клеточных линий, не экспрессирующих антиген CA19-9 (аденокарцином яичников OAW 4, молочной железы MCF-7, предстательной железы PC3, гепатоцеллюлярной карциномы HepG2 и фибробластов кожи человека HDF), статистически значимой разницы в жизнеспособности клеток не наблюдалось.

Пиридоксаль-5'-фосфат-зависимая метионин-γ-лиаза (КФ 4.4.1.11, МГЛ), помимо физиологической реакции γ-элиминирования L-метионина [51], катализирует реакцию β-элиминирования S-замещённых аналогов L-цистеина, в том числе сульфоксидов S-алк(ен)ил-L-цистеина, продуктами которой являются тиосульфиды [52, 53]. Поскольку тиосульфиды окисляют сульфгидрильные группы белков и могут ингибировать МГЛ, были созданы мутантные формы фермента из нескольких бактериальных источников с заменой остатка цистеина-115 их активных центров на гистидин (С115Н МГЛ, нумерация согласно аминокислотной последовательности МГЛ *Citrobacter freundii*).

Мутантные формы эффективно катализировали реакцию расщепления сульфоксидов S-алк(ен)ил-L-цистеина [54, 55] и были использованы в качестве ферментной составляющей фармакологической пары для испытания цитотоксической и противоопухолевой активностей тиосульфидов, образующихся *in situ*. При использовании подхода ферментной пролекарственной терапии необходимо, чтобы введённый ферментный компонент был активен в плазме в течение периода, необходимого для получения достаточного количества лекарства из пролекарства. Нативная МГЛ быстро выводится из кровотока [56]. Для улучшения фармакокинетических параметров С115Н МГЛ было использовано несколько общепринятых подходов, таких как пэгилирование, инкапсулирование в липосомы и полиионные везикулы (ПИКсомы) [57] и модификация фермента полисиаловой кислотой [25]. Инкапсулирование в ПИКсомы продлило стабильность С115Н МГЛ в кровотоке более чем на 42 ч по сравнению с пэгилированным ферментом [57]. Период полувыведения С115Н МГЛ, конъюгированной с полисиаловой кислотой, также увеличился в 3–6 раз по сравнению с нативным ферментом. В реакции с сульфоксидами S-замещённого L-цистеина каталитическая эффективность как инкапсулированного в ПИКсомы фермента, так и его модифицированной полисиаловой кислотой формы была сравнима с таковой для нативной С115Н МГЛ. Цитотоксический эффект аллицина, ДМТС, ДЭТС и ДПТС, получаемых в парах С115Н МГЛ/сульфоксиды S-(аллил/алкил) замещённого L-цистеина, был показан *in vitro* на линиях аденокарциномы MCF-7, SCOV-3 и SW-620 (табл. 4).

Таблица 4. Цитотоксичность тиосульфидов, производимых фармакологическими парами С115Н МГЛ/сульфоксид

Тиосульфид	Клеточная линия		
	MCF-7	SCOV-3	SW-620
	IC ₅₀ , мкМ		
Аллицин	30,80	104,7	40,12
ДМТС	68,05	127,04	108,90
ДЭТС	21,70	119,39	36,17
ДПТС	15,03	87,19	19,24

Значения IC_{50} для аллицина и ДМТС для линии MCF-7 оказались близки к полученным данным для синтетических тиосульфидов (44 мкМ и > 50 мкМ соответственно) [17]. Для ДЭТС и ДПТС показан самый высокий цитотоксический эффект на линиях MCF-7 и SW-620 ($IC_{50} < 36$ мкМ). Значения IC_{50} синтетических тиосульфидов для линии MCF-7 составляли более 50 мкМ [17]. Для клеток SCOV-3 значения IC_{50} для аллицина были аналогичны данным, полученным для синтетического аллицина (93 мкМ) для этой линии [24].

Примечательно, что для всех клеточных линий наблюдалось усиление цитотоксического действия тиосульфидов с увеличением длины цепи алкильных радикалов (табл. 4). Впервые факт увеличения бактерицидного действия тиосульфидов на грамположительные бактерии с увеличением длины их алкильных групп был отмечен в работе Small et al. [9], где авторы предположили, что удлинение алкильной группы делает соединения более липофильными, позволяя им эффективно атаковать сульфгидрильные группы белков.

Сохранение каталитической активности фермента C115H, инкапсулированного в ПИКсомы, цитотоксический эффект фармакологической пары C115H МГЛ + сульфоксиды S-замещённого L-цистеина, сравнимый с таковым для синтетических тиосульфидов, высокая биодоступность инкапсулированного в ПИКсомы фермента — все эти факты показали перспективность применения фармакологической пары как потенциального нового противоопухолевого средства. Для направленной доставки пары к ER^+ опухолям C115H МГЛ была конъюгирована с дайдзеном [22]. Конъюгат (C115H-Dz) связывался с линиями MCF-7, SKBR3, MDA-MB-231 и T-47D рака молочной железы и в присутствии сульфоксидов S-(аллил/алкил)-L-цистеина проявлял цитотоксический эффект (табл. 5). Конъюгирование увеличило время полувыведения фермента с 4,2 ч до 7,2 ч. Противоопухолевое действие фармакологической пары C115H-Dz/пропиин было проверено *in vivo* на ксенотрансплантатах SKBR-3: пара ингибировала рост опухоли на 85% (дозировка составила 30 ед. конъюгата, 30 мг/мл пропиина).

В работе Abo Qoura et al. [29] была исследована цитотоксическая и противоопухолевая активность фармакологической пары C115H-Dz/пропиин на линиях солидных опухолей HT-29, COLO205 и HCT116 (рак толстой кишки), Panc1 и MIA-PaCa2 (рак поджелудочной железы), 22Rv1, DU-145 и PC3 (рак предстательной железы).

Таблица 5. Цитотоксичность конъюгата C115H МГЛ-Dz в присутствии сульфоксидов S-замещённого L-цистеина

Сульфоксид (1 мг/мл)	Клеточная линия			
	MCF-7	SKBR3	MDA-MB-231	T-47D
	IC_{50} , мкМ			
Метиин	0,48	14,5	> 18,6	2,81
Этиин	0,35	0,8	> 18,6	2,28
Пропиин	0,53	1,15	> 18,6	1,97
Аллиин	1,38	1,0	> 18,6	2,13

In vitro на клеточных линиях рака толстой кишки лучший эффект наблюдался для HT-29 ($IC_{50} = 6,9$ мкМ). Значения IC_{50} для MIA-PaCa2 и Panc1 составляли 3,4 и 3,8 мкМ соответственно. Среди клеточных линий рака предстательной железы наиболее чувствительной к ДПТС оказалась линия 22Rv1 ($IC_{50} = 5,4$ мкМ). *In vivo* противоопухолевая активность фармакологической пары была изучена на подкожных ксенотрансплантатах HT-29, SW-620, Panc1, MIA-PaCa2 и 22Rv1 у мышей BALB/c nude. При терапии животных фармакологической парой C115H-Dz/пропиин наблюдалось значительное уменьшение объёма опухолей Panc1, MIA-PaCa2, HT-29 и 22Rv1 (дозировка компонентов фармакологической пары составляла 30 ед. конъюгата, 30 мг/мл пропиина).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Интенсивные исследования тиосульфидов как потенциальных средств терапии рака начались сравнительно недавно. Несмотря на подтверждённые многообразные биологические активности аллицина, этот тиосульфид мало применяется в фармакологии. Это, вероятно, во многом объясняется его химической нестабильностью и летучестью [3–5]. Кроме того, в крови аллицин очень быстро метаболизируется [6, 7]. Представленные в обзоре результаты позволяют считать, что более стабильные тиосульфиды с предельными или ароматическими заместителями могут быть новыми перспективными противоопухолевыми средствами, действующими в том числе против опухолей со множественной лекарственной устойчивостью. Поскольку тиосульфиды имеют множество мишеней в организме, окисляя серосодержащие белки, и могут оказывать

цитотоксический эффект на здоровые клетки, использование метода получения тиосульфидов *in situ* с помощью ферментативной реакции непосредственно у поверхности опухолевой клетки обещает стать перспективным направлением в терапии злокачественных новообразований. Имеющиеся в литературе данные свидетельствуют о том, что использование фармакологических пар в направленной ферментной терапии позволяет обеспечивать эффективное образование тиосульфидов непосредственно в области опухоли и тем самым уменьшать их цитотоксическое действие на нормальные клетки организма. В перспективе такие препараты можно было бы использовать в комбинированной терапии с другими известными цитостатическими агентами с целью уменьшения вероятности возникновения резистентности к применяемым препаратам у раковых

клеток, а также для ликвидации вторичных очагов опухолевого роста.

Вклад авторов. В.В. Куликова писала статью; С.В. Ревтович оформляла рисунки; Е.А. Морозова осуществляла поиск и подбор литературных источников; В.С. Коваль оформлял таблицы; П.Н. Сольев анализировал литературные данные; Т.В. Демидкина координировала все работы.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 20-74-10121).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Miekus, N., Marszałek, K., Podlacha, M., Iqbal, A., Puchalski, C., and Swiergiel, A. H. (2020) Health benefits of plant-derived sulfur compounds, glucosinolates, and organosulfur compounds, *Molecules*, **25**, 3804, doi: 10.3390/molecules25173804.
2. Lawson, L. D. (1996) The composition and chemistry of garlic cloves and processed garlic, in: *Garlic: The Science and Therapeutic Application of Allium sativum L. and Related Species* (Koch, H. P., and Lawson, L. D., eds) 2nd Edn., Williams & Wilkins, Baltimore.
3. Borlinghaus, J., Albrecht, F., Gruhlke, M. C., Nwachukwu, I. D., and Slusarenko, A. J. (2014) Allicin: chemistry and biological properties, *Molecules*, **19**, 12591-12618, doi: 10.3390/molecules190812591.
4. Batiha, G., Beshbishy, A. M., Wasef, L. G., Elewa, Y. H. A., Al-Sagan, A. A., Abd El-Hack, M. E., Taha, A. E., Abd-Elhakim, Y. M., and Devkota, H. P. (2020) Chemical constituents and pharmacological activities of garlic (*Allium sativum* L.): a review, *Nutrients*, **12**, 872, doi: 10.3390/nu12030872.
5. Borlinghaus, J., Foerster Née Reiter, J., Kappler, U., Antelmann, H., Noll, U., Gruhlke, M. C. H., and Slusarenko, A. J. (2021) Allicin, the odor of freshly crushed garlic: a review of recent progress in understanding allicin's effects on cells, *Molecules*, **26**, 1505, doi: 10.3390/molecules26061505.
6. Catanzaro, E., Canistro, D., Pellicioni, V., Vivarelli, F., and Fimognari, C. (2022) Anticancer potential of allicin: A review, *Pharmacol. Res.*, **177**, 106118, doi: 10.1016/j.phrs.2022.106118.
7. Rose, P., Whiteman, M., Moore, P. K., and Zhu, Y. Z. (2005) Bioactive S-alk(en)yl cysteine sulfoxide metabolites in the genus *Allium*: the chemistry of potential therapeutic agents, *Nat. Prod. Rep.*, **22**, 351-368, doi: 10.1039/b417639c.
8. Shen, C., Xiao, H., and Parkin, K. L. (2002) In vitro stability and chemical reactivity of thiosulfonates, *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 2644-2651, doi: 10.1021/jf011013e.
9. Small, L. D., Bailey, J. H., and Cavallito, C. J. (1947) Alkyl Thiolsulfonates, *J. Am. Chem. Soc.*, **69**, 1710-1713, doi: 10.1021/ja01199a040.
10. Stellenboom, N., Hunter, R., Caira, M. R., Bourne, S. A., Cele, K., Qwebani, T., and le Roex, T. (2007) Synthesis and inclusion of S-aryl alkylthiosulfonates as stable allicin mimics, *ARKIVOC*, **9**, 53-63, doi: 10.3998/Ark.5550190.0008.907.
11. Weisberger, A. S., and Pensky, J. (1957) Tumor-inhibiting effects derived from an active principle of garlic (*Allium sativum*), *Science*, **126**, 1112-1114, doi: 10.1126/science.126.3283.1112-a.
12. Merhi, F., Auger, J., Rendu, F., and Bauvois, B. (2008) Allium compounds, dipropyl and dimethyl thiosulfonates as antiproliferative and differentiating agents of human acute myeloid leukemia cell lines, *Biologics*, **2**, 885-895, doi: 10.2147/btt.s3212.
13. Miron, T., Wilchek, M., Sharp, A., Nakagawa, Y., Naoi, M., Nozawa, Y., and Akao, Y. (2008) Allicin inhibits cell growth and induces apoptosis through the mitochondrial pathway in HL60 and U937 cells, *J. Nutr. Biochem.*, **19**, 524-535, doi: 10.1016/j.jnutbio.2007.06.009.
14. Arditti, F. D., Rabinkov, A., Miron, T., Reisner, Y., Berrebi, A., Wilchek, M., and Mirelman, D. (2005) Apoptotic killing of B-chronic lymphocytic leukemia tumor cells by allicin generated in situ using a

- rituximab-alliinase conjugate, *Mol. Cancer Ther.*, **4**, 325-331, doi: 10.1158/1535-7163.325.4.2.
15. Patya, M., Zahalka, M. A., Vanichkin, A., Rabinkov, A., Miron, T., Mirelman, D., Wilchek, M., Lander, H. M., and Novogrodsky, A. (2004) Allicin stimulates lymphocytes and elicits an antitumor effect: a possible role of P21ras, *Int. Immunol.*, **16**, 275-281, doi: 10.1093/intimm/dxh038.
 16. Padilla-Camberos, E., Zaitseva, G., Padilla, C., and Puebla, A. M. (2010) Antitumoral activity of allicin in murine lymphoma L5178Y, *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, **11**, 1241-1244.
 17. Roseblade, A., Ung, A., and Bebawy, M. (2017) Synthesis and in vitro biological evaluation of thiosulfinate derivatives for the treatment of human multidrug-resistant breast cancer, *Acta Pharmacol. Sin.*, **38**, 1353-1368, doi: 10.1038/aps.2016.170.
 18. Park, K. W., Kim, S. Y., Jeong, I. Y., Byun, M. W., Park, K. H., Yamada, K., and Seo, K. I. (2007) Cytotoxic and antitumor activities of thiosulfates from *Allium tuberosum* L., *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 7957-7961, doi: 10.1021/jf0713051.
 19. Ossama, M., Hathout, R. M., Attia, D. A., and Mortada, N. D. (2019) Enhanced allicin cytotoxicity on HEPG-2 cells using glycyrrhetic acid surface-decorated gelatin nanoparticles, *ACS Omega*, **4**, 11293-11300, doi: 10.1021/acsomega.9b01580.
 20. Hirsch, K., Danilenko, M., Giat, J., Miron, T., Rabinkov, A., Wilchek, M., Mirelman, D., Levy, J., and Sharoni, Y. (2000) Effect of purified allicin, the major ingredient of freshly crushed garlic, on cancer cell proliferation, *Nutr. Cancer*, **38**, 245-254, doi: 10.1207/S15327914NC382_14.
 21. Bhaumik, I., Pal, K., Debnath, U., Karmakar, P., Jana, K., and Misra, A. K. (2019) Natural product inspired allicin analogs as novel anti-cancer agents, *Bioorg. Chem.*, **86**, 259-272, doi: 10.1016/j.bioorg.2019.01.057.
 22. Morozova, E., Abo Qoura, L., Anufrieva, N., Koval, V., Lesnova, E., Kushch, A., Kulikova, V., Revtovich, S., Pokrovsky, V. S., and Demidkina, T. (2022) Daidzein-directed methionine γ -lyase in enzyme prodrug therapy against breast cancer, *Biochimie*, **201**, 177-183, doi: 10.1016/j.biochi.2022.05.007.
 23. Miron, T., Mironchik, M., Mirelman, D., Wilchek, M., and Rabinkov, A. (2003) Inhibition of tumor growth by a novel approach: in situ allicin generation using targeted alliinase delivery, *Mol. Cancer Ther.*, **2**, 1295-1301.
 24. Appel, E., Rabinkov, A., Neeman, M., Kohen, F., and Mirelman, D. (2011) Conjugates of daidzeinaliinase as a targeted pro-drug enzyme system against ovarian carcinoma, *J. Drug Target*, **19**, 326-335, doi: 10.3109/1061186X.2010.504265.
 25. Morozova, E., Anufrieva, N., Koval, V., Lesnova, E., Kushch, A., Timofeeva, V., Solovieva, A., Kulikova, V., Revtovich, S., and Demidkina, T. (2021) Conjugates of methionine γ -lyase with polysialic acid: two approaches to antitumor therapy, *Int. J. Biol. Macromol.*, **182**, 394-401, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.03.201.
 26. Tyagi, G., Pradhan, S., Srivastava, T., and Mehrotra, R. (2014) Nucleic acid binding properties of allicin: spectroscopic analysis and estimation of anti-tumor potential, *Biochim. Biophys. Acta*, **1840**, 350-356, doi: 10.1016/j.bbagen.2013.09.007.
 27. Sun, L., and Wang, X. (2003) Effects of allicin on both telomerase activity and apoptosis in gastric cancer SGC-7901 cells, *World J. Gastroenterol.*, **9**, 1930-1934, doi: 10.3748/wjg.v9.i9.1930.
 28. Lee, J. H., Yang, H. S., Park, K. W., Kim, J. Y., Lee, M. K., Jeong, I. Y., Shim, K. H., Kim, Y. S., Yamada, K., and Seo, K. I. (2009) Mechanisms of thiosulfates from *Allium tuberosum* L.-induced apoptosis in HT-29 human colon cancer cells, *Toxicol. Lett.*, **188**, 142-147, doi: 10.1016/j.toxlet.2009.03.025.
 29. Abo Qoura, L., Morozova, E., Kulikova, V., Karshieva, S., Sokolova, D., Koval, V., Revtovich, S., Demidkina, T., and Pokrovsky, S. V. (2022) Methionine γ -lyase-daidzein in combination with S-propyl-L-cysteine sulfoxide as a targeted prodrug enzyme system for malignant solid tumor xenografts, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 12048, doi: 10.3390/ijms231912048.
 30. Kim, S. Y., Park, K. W., Kim, J. Y., Shon, M. Y., Yee, S. T., Kim, K. H., Rhim, J. S., Yamada, K., and Seo, K. I. (2008) Induction of apoptosis by thiosulfates in primary human prostate cancer cells, *Int. J. Oncol.*, **32**, 869-875.
 31. Kim, S. Y., Park, K. W., Kim, J. Y., Jeong, I. Y., Byun, M. W., Park, J. E., Yee, S. T., Kim, K. H., Rhim, J. S., Yamada, K., and Seo, K. I. (2008) Thiosulfates from *Allium tuberosum* L. induce apoptosis via caspase-dependent and -independent pathways in PC-3 human prostate cancer cells, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **18**, 199-204, doi: 10.1016/j.bmcl.2007.10.099.
 32. Mondal, A., Banerjee, S., Bose, S., Mazumder, S., Haber, R. A., Farzaei, M. H., and Bishayee, A. (2021) Garlic constituents for cancer prevention and therapy: from phytochemistry to novel formulations, *Pharm. Res.*, **175**, 105837, doi: 10.1016/j.phrs.2021.105837.
 33. De Greef, D., Barton, E. M., Sandberg, E. N., Croley, C. R., Pumarol, J., Wong, T. L., Das, N., and Bishayee, A. (2021) Anticancer potential of garlic and its bioactive constituents: a systematic and comprehensive review, *Semin. Cancer Biol.*, **73**, 219-264, doi: 10.1016/j.semcancer.2020.11.020.
 34. Rauf, A., Abu-Izneid, T., Thiruvengadam, M., Imran, M., Olatunde, A., Shariati, M. A., Bawazeer, S., Naz, S., Shirooie, S., Sanches-Silva, A., Farooq, U., and Kazhybayeva, G. (2022) Garlic (*Allium sativum* L.): its chemistry, nutritional composition, toxicity, and anticancer properties, *Curr. Top. Med. Chem.*, **22**, 957-972, doi: 10.2174/1568026621666211105094939.

35. Mitra, S., Das, R., Emran, T. B., Labib, R. K., Noor-E-Tabassum, I. F., Sharma, R., Ahmad, I., Nainu, F., Chidambaram, K., Alhumaydhi, F. A., Chandran, D., Capasso, R., and Wilairatana, P. (2022) Diallyl disulfide: a bioactive garlic compound with anticancer potential, *Front. Pharmacol.*, **22**, 943967, doi: 10.3389/fphar.2022.943967.
36. Kaschula, C. H., Hunter, R., and Parker, M. I. (2010) Garlic-derived anticancer agents: structure and biological activity of ajoene, *Biofactors*, **36**, 78-85, doi: 10.1002/biof.76.
37. Cavallito, C. J., and Bailey, J. H. (1944) Allicin, the antibacterial principle of *Allium sativum*. I. Isolation, physical properties and antibacterial action, *J. Am. Chem. Soc.*, **66**, 1950-1951.
38. Cavallito, C. J., Buck, J. S., and Suter, C. M. (1944) Allicin, the antibacterial principle of *Allium sativum*. II. Determination of the chemical structure, *J. Am. Chem. Soc.*, **66**, 1952-1954, doi: 10.1021/ja01239a049.
39. Rabinkov, A., Miron, T., Konstantinovski, L., Wilchek, M., Mirelman, D., and Weiner, L. (1998) The mode of action of allicin: trapping of radicals and interaction with thiol containing proteins, *Biochim. Biophys. Acta*, **1379**, 233-244, doi: 10.1016/s0304-4165(97)00104-9.
40. Gruhlke, M. C. H., Antelmann, H., Bernhardt, J., Kloubert, V., Rink, L., and Slusarenko, A. J. (2019) The human allicin-proteome: S-thioallylation of proteins by the garlic defence substance allicin and its biological effects, *Free Radic. Biol. Med.*, **131**, 144-153, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.11.022.
41. Watanabe, Y., Muroi, R., Tsuchiya, H., Uda, Y., and Hashimoto, K. (2013) Inhibitory effect of methyl methanethiosulfinate on β -glucuronidase activity, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **77**, 2325-2327, doi: 10.1271/bbb.130510.
42. Takada, H., Hirooka, T., Hiramatsu, Y., and Yamamoto, M. (1982) Effect of beta-glucuronidase inhibitor on azoxymethane-induced colonic carcinogenesis in rats, *Cancer Res.*, **42**, 331-334.
43. Morita, N., Walaszek, Z., Kinjo, T., Nishimaki, T., Hanausek, M., Slaga, T. J., Mori, H., and Yoshimi, N. (2008) Effects of synthetic and natural in vivo inhibitors of β -glucuronidase on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rats, *Mol. Med. Rep.*, **1**, 741-746, doi: 10.3892/mmr.00000022.
44. Luo, R., Fang, D., Hang, H., and Tang, Z. (2016) The mechanism in gastric cancer chemoprevention by allicin, *Anticancer Agents Med. Chem.*, **16**, 802-809, doi: 10.2174/187152061666615111115443.
45. Rendu, F., Brohard-Bohn, B., Pain, S., Bachelot-Loza, C., and Auger, J. (2001) Thiosulfates inhibit platelet aggregation and microparticle shedding at a calpain-dependent step, *Thromb. Haemost.*, **86**, 1284-1291, doi: 10.1055/s-0037-1616063.
46. Shapovalov, I., Harper, D., and Greer, P. A. (2022) Calpain as a therapeutic target in cancer, *Expert Opin. Ther. Targets*, **26**, 217-231, doi: 10.1080/14728222.2022.2047178.
47. Badol, P., David-Dufilho, M., Auger, J., Whiteheart, S. W., and Rendu, F. (2007) Thiosulfates modulate platelet activation by reaction with surface free sulfhydryls and internal thiol-containing proteins, *Platelets*, **18**, 481-490, doi: 10.1080/09537100701271828.
48. Block, E., Bechand, B., Gundala, S., Vattekkatte, A., Wang, K., Mousa, S. S., Godugu, K., Yalcin, M., and Mousa, S. A. (2017) Fluorinated analogs of organosulfur compounds from garlic (*Allium sativum*): synthesis, chemistry and anti-angiogenesis and antithrombotic studies, *Molecules*, **22**, 2081, doi: 10.3390/molecules22122081.
49. Philpott, G. W., Bower, R. J., Parker, K. L., Shearer, W. T., and Parker, C. W. (1974) Affinity cytotoxicity of tumor cells with antibody-glucose oxidase conjugates, peroxidase, and arspenamine, *Cancer Res.*, **34**, 2159-2164.
50. Chhabria, S. V., Akbarsha, M. A., Li, A. P., Kharkar, P. S., and Desai, K. B. (2015) In situ allicin generation using targeted alliinase delivery for inhibition of MIA PaCa-2 cells via epigenetic changes, oxidative stress and cyclin-dependent kinase inhibitor (CDKI) expression, *Apoptosis*, **20**, 1388-1409, doi: 10.1007/s10495-015-1159-4.
51. Tanaka, H., Esaki, N., and Soda, K. (1977) Properties of L-methionine gamma-lyase from *Pseudomonas ovalis*, *Biochemistry*, **16**, 100-106, doi: 10.1021/bi00620a016.
52. Morozova, E. A., Revtovich, S. V., Anufrieva, N. V., Kulikova, V. V., Nikulin, A. D., and Demidkina, T. V. (2014) Alliin is a suicide substrate of *Citrobacter freundii* methionine γ -lyase: structural bases of inactivation of the enzyme, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **70**, 3034-3042, doi: 10.1107/S1399004714020938.
53. Anufrieva, N. V., Morozova, E. A., Kulikova, V. V., Bazhulina, N. P., Manukhov, I. V., Degtev, D. I., Gnuchikh, E. Yu., Rodionov, A. N., Zavilgelsky, G. B., and Demidkina, T. V. (2015) Sulfoxides, analogues of L-methionine and L-cysteine as pro-drugs against gram-positive and gram-negative bacteria, *Acta Naturae*, **7**, 128-135, doi: 10.32607/20758251-2015-7-4-128-135.
54. Morozova, E., Kulikova, V., Rodionov, A., Revtovich, S., Anufrieva, N., and Demidkina, T. (2016) Engineered *Citrobacter freundii* methionine γ -lyase effectively produces antimicrobial thiosulfates, *Biochimie*, **128-129**, 92-98, doi: 10.1016/j.biochi.2016.07.007.
55. Kulikova, V. V., Anufrieva, N. V., Revtovich, S. V., Chernov, A. S., Telegin, G. B., Morozova, E. A., and Demidkina, T. V. (2016) Mutant form C115H of *Clostridium sporogenes* methionine γ -lyase efficiently cleaves S-Alk(en)yl-L-cysteine sulfoxides to antibacterial thiosulfates, *IUBMB Life*, **68**, 830-835, doi: 10.1002/iub.1562.

56. Morozova, E. A., Anufrieva, N. V., Davydov, D. Zh., Komarova, M. V., Dyakov, I. N., Rodionov, A. N., Demidkina, T. V., and Pokrovsky, V. S. (2017) Plasma methionine depletion and pharmacokinetic properties in mice of methionine γ -lyase from *Citrobacter freundii*, *Clostridium tetani* and *Clostridium sporogenes*, *Biomed. Pharmacother.*, **88**, 978-984, doi: 10.1016/j.biopha.2017.01.127.
57. Morozova, E. A., Kulikova, V. V., Anufrieva, N. V., Minakov, A. N., Chernov, A. S., Telegin, G. B., Revtovich, S. V., Koval, V. S., and Demidkina, T. V. (2019) Methionine γ -lyase in enzyme pro-drug therapy: An improvement of pharmacokinetic parameters of the enzyme, *Int. J. Biol. Macromol.*, **140**, 1277-1283, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.08.224.

THIOSULFINATES: CYTOTOXIC AND ANTITUMOR ACTIVITY

Review

V. V. Kulikova*, E. A. Morozova, V. S. Koval, P. N. Sol'yev,
T. V. Demidkina, and S. V. Revtovich

*Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences,
119991 Moscow, Russia; e-mail: vitviku@yandex.ru*

The pharmacological value of some natural compounds makes them attractive for use in oncology. Sulfur-containing thiosulfinates found in plants of the genus *Allium* have long been known as compounds with various therapeutic properties, including antitumor. In recent years, the effect of thiosulfinates on various stages of carcinogenesis has been actively studied. *In vitro* and *in vivo* studies have shown that thiosulfinates inhibit the proliferation of cancer cells, as well as induce apoptosis. The purpose of this review is to summarize current data on the use of natural and synthetic thiosulfinates in cancer therapy. Antitumor mechanisms and molecular targets of these promising compounds are discussed. A significant part of the review is devoted to the consideration of a new strategy for the treatment of oncological diseases — the use of the method of directed enzyme prodrug therapy with the possibility of obtaining antitumor thiosulfinates *in situ*.

Keywords: natural and synthetic thiosulfinates, cytostatic activity, antitumor activity, targeted enzyme prodrug therapy

S-ГЛУТАТИОНИЛИРОВАНИЕ И S-НИТРОЗИЛИРОВАНИЕ КАК МОДУЛЯТОРЫ РЕДОКС-ЗАВИСИМЫХ ПРОЦЕССОВ В ОПУХОЛЕВОЙ КЛЕТКЕ

Обзор

© 2023 Е.В. Калинина*, М.Д. Новичкова

Российский университет дружбы народов,
117198 Москва, Россия; электронная почта: kalinina-ev@rudn.ru

Поступила в редакцию 10.02.2023

После доработки 10.03.2023

Принята к публикации 11.03.2023

Развитие окислительного/нитрозативного стресса, связанного с активацией онкогенных путей, является следствием роста уровня генерации активных форм кислорода и азота (АФК/АФА) в опухолевых клетках. Действие АФК/АФА имеет двойственный характер: высокие уровни вызывают клеточную гибель и ограничение опухолевого роста на определенных фазах развития злокачественных новообразований, тогда как низкие концентрации позволяют осуществлять окислительные/нитрозативные модификации ключевых редокс-зависимых остатков в регуляторных белках. Обратимость таких модификаций, как S-глутатионилирование/S-нитрозилирование, которые происходят посредством электрофильной атаки АФК/АФА на нуклеофильные остатки Cys, обеспечивает редокс-переключение активности сигнальных белков и возможность управления процессами пролиферации и программированной гибели. Уровень S-глутатионилированных и S-нитрозилированных белков контролируется балансом между S-глутатионилированием/деглутатионилированием и S-нитрозилированием/денитрозилированием, соотношение которых зависит от клеточного редокс-статуса. Степень S-глутатионилирования и S-нитрозилирования белковых мишеней и их соотношение во многом определяют состояние и направление сигнальных путей в опухолевых клетках. В обзоре рассматриваются особенности реакций S-глутатионилирования и S-нитрозилирования в опухолевых клетках, баланс систем, контролирующих их активность и их связь с редокс-зависимыми процессами и опухолевым ростом.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: активные формы кислорода и азота, окислительный и нитрозативный стресс, S-глутатионилирование и деглутатионилирование, S-нитрозилирование, *транс*-нитрозилирование, денитрозилирование.

DOI: 10.31857/S0320972523070060, EDN: FFXQLC

ВВЕДЕНИЕ

Редокс-баланс, во многом определяемый соотношением между генерацией активных форм кислорода (АФК) и активных форм азота (АФА), с одной стороны, и уровнем антиоксидантной системы — с другой, служит основанием для клеточного редокс-гомеостаза, состояние которого крайне важно для активно-

сти основных биологических процессов, включая пролиферацию/дифференцировку клеток, метаболический гомеостаз и иммунные реакции [1, 2]. АФК/АФА постоянно генерируются как побочные продукты различных клеточных процессов, и изменение их уровня выше физиологического редокс-диапазона способствуют развитию окислительного/нитрозативного стресса [3, 4]. Хронический характер такого

Принятые сокращения: АФА — активные формы азота; АФК — активные формы кислорода; ПФП — пентозофосфатный путь; РПЖ — рак предстательной железы; ЭТЦ — электрон-транспортная цепь; GAPDH — глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа; Grx — гутаредоксин; GSH и GSSG — восстановленный и окисленный глутатион; GSNO — нитрозоглутатион; GSNO — S-нитрозоглутатионредуктаза; NF-κB — ядерный фактор κB; NO — оксид азота; NOS — NO-синтаза; Nrf2 — NF-E2-зависимый фактор 2; PDI — протеин-дисульфид изомераза; PKC — протеинкиназа C; Pr-SH — тиол белка; Pr-SSG — S-глутатионилированный белок; Prx — пероксиредоксин; Srx — сульфиредоксин; Trx — тиоредоксин; TrxR — тиоредоксинредуктаза.

* Адресат для корреспонденции.

стресса приводит к повреждению клеток, тканей и органов и связан с патогенезом различных заболеваний, в том числе онкологических [3].

Отличительной чертой многих злокачественных новообразований и линий опухолевых клеток является развитие «мягкого» окислительного/нитрозативного стресса, который связан с активацией онкогенных путей и появление которого является следствием роста уровня генерации АФК/АФА, частично скомпенсированного адаптивным повышением активности систем их элиминации [2, 5]. Соответственно, продукция АФК/АФА опухолевыми клетками является результатом редокс-зависимой модуляции многочисленных сигнальных путей, влияющих на клеточный метаболизм [6]. Окислительный/нитрозативный стресс может способствовать прогрессированию опухолевого роста вследствие нестабильности генома и хромосомных аномалий с усиленной активацией онкогенов и подавлением онкосупрессоров, изменением метаболизма опухолевых клеток [7]. Повреждение ДНК приводит к гидролизу оснований ДНК с образованием аддуктов, которые нарушают нормальный рост клеток за счет индукции генных мутаций и изменения нормальной транскрипции генов.

Опухолевые клетки адаптируются к окислительному стрессу в краткосрочной перспективе за счет метаболического перепрограммирования и в долгосрочной перспективе — за счет генетического репрограммирования [3]. Существенную роль в системе адаптационного механизма играют реакции посттрансляционной модификации, приводящие к редокс-зависимому изменению функциональной активности белков [8]. Низкие концентрации АФК/АФА, поддерживаемые активностью эндогенной антиоксидантной системы, позволяют осуществлять модификации посредством электрофильной атаки АФК/АФА на нуклеофильные группы аминокислотных остатков в регуляторных белках. Обратимый характер таких реакций обеспечивает редокс-переключения в активности сигнальных белков. Среди редокс-модификаций реакции S-глутатионилирования и S-нитрозилирования, осуществляемые через SH-группу остатков Cys в белке, наиболее часто встречаемые в опухолевых клетках [9–12]. Уровень активности этих реакций во многом связан с прогрессией опухолевого роста.

В настоящем обзоре анализируются особенности реакций S-глутатионилирования и S-нитрозилирования в опухолевых клетках, баланс систем, контролирующих их актив-

ность и их связь с редокс-зависимыми процессами и опухолевым ростом.

ИСТОЧНИКИ ОБРАЗОВАНИЯ АФК В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ. РАЗВИТИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА

Опухолевые клетки характеризуются повышенной генерацией АФК, что в значительной степени инициируется действием физических факторов и онкогенов, инициирующих злокачественную трансформацию [3, 13]. Основными продуцентами АФК в клетке являются митохондрии, где в норме 0,2–2% потока электронов с комплексов I, II и III электрон-транспортной цепи (ЭТЦ) уходит на образование супероксида ($O_2^{\bullet-}$), который быстро дисмутирует до перекиси водорода (H_2O_2), действующей как «вторичный мессенджер» в передаче сигнала благодаря относительно длительному периоду ее полураспада и способности к диффузии через аквапориновые каналы мембран с последующим образованием в результате реакции Фентона высокореакционноспособных гидроксильных радикалов в присутствии ионов металлов переменной валентности (Fe^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+}). Взаимодействие супероксида с NO приводит к образованию пероксинитрита ($ONOO^-$), способного контролировать сигнальные пути посредством нитрования остатков тирозина в белках-мишенях [1].

Мутации в компонентах ЭТЦ, способствующие усиленному образованию АФК, отмечаются во многих типах опухолей, что подтверждает значимую роль этого механизма в модуляции фенотипа опухолевых клеток [14]. Мутации NADH-дегидрогеназы (комплекс I) млекопитающих (содержащей 44 субъединицы, семь из которых (ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5 и ND6) кодируются митохондриальной ДНК, остальные — ядерным геномом) могут приводить к увеличению продукции $O_2^{\bullet-}$, поддерживая АФК-зависимые пути онкогенеза. Так, мутации гена *ND2* способствуют онкогенезу и метастазированию при раке молочной железы, поджелудочной железы и ротовой полости, карциномах головы и шеи. Подобные корреляции обнаружены для мутаций гена *ND6* при раке легких, гена *ND4* — при остром миелоидном лейкозе и глиобластоме [14, 15]. Мутации гена *ND6*, вызывающие снижение активности комплекса I и повышение образования АФК, усиливают пролиферацию как гипер-, так и гипометастатических сублиний клеток карциномы легких Льюиса, которая подавляется «скэвенджерами» АФК [16].

Мутации, приводящие к снижению функции комплекса II при наследственной феохромоцитоме/параганглиоме и почечно-клеточном раке, вызывают рост образования АФК и подавление синтеза АТФ за счет окислительного фосфорилирования [17, 18].

Действие онкогенов может в значительной степени усиливать образование АФК не только в митохондриях, но и за счет активации прооксидантных ферментов. Онкоген K-RAS не только повышает митохондриальный уровень АФК, вызывая трансформацию ацинарных клеток поджелудочной железы в интраэпителиальную неоплазию поджелудочной железы, но и активирует NOX2 и NOX4 — изоформы NADPH-оксидазы, основной функцией которой является образование $O_2^{\bullet -}$ [19, 20].

Как и RAS, c-Myc индуцирует сложную метаболическую перестройку в опухолевых клетках, что достигается за счет стимуляции гликолиза, митохондриального биогенеза и глутаминолиза [14]. На клеточных линиях глиомы показано, что Myc контролирует программу транскрипции, которая способствует катаболизму глутамината в качестве источника углерода для подпитки цикла трикарбоновых кислот, тем самым поддерживая выработку АФК с помощью ЭТЦ [21], в то же время повышение экспрессии MYC в линии P493-6 В-клеток приводит к увеличению митохондриальной массы, скорости потребления кислорода и показателя активности ЭТЦ, что стимулирует выработку АФК посредством усиленного потока электронов через ЭТЦ [22].

Важным источником АФК в опухолевых клетках, как отмечено выше, является активность изоформ NOX, принадлежащих к семейству NADPH-оксидазы, которое состоит из семи изоферментов (NOX1–NOX5, DUOX1, DUOX2), переносящих электроны от NADPH(H^+) через мембраны на молекулярный кислород с образованием супероксида [23]. Повышенная экспрессия гена изоформы NOX2 отмечается при раке груди, толстой кишки, желудка и простаты, а также при миеломоноцитарном лейкозе [24]. Гиперэкспрессия гена NOX4 установлена в клеточных линиях рака предстательной железы (РПЖ) DU145, PC-3 и LNCaP [25]. Подавление экспрессии гена NOX2 приводит к значительному снижению активности киназы IKK ϵ (inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit epsilon), ключевого игрока в трансформации клеток, инвазивности и развитии химиорезистентности [26]. В зависимости от уровня экспрессии гена и клеточного контекста изоформа NOX5 может играть двойную роль в опухолевых клетках, способствуя гиб-

ли клеток через регуляцию уровня ионов Ca^{2+} и активности киназы c-ABL либо стимулируя рост опухоли при некоторых видах рака через транскрипционные факторы STAT5A (signal transducer and activator of transcription 5A) и CREB (cAMP response element-binding protein). Таким образом, NOX5 может определять баланс клеточной пролиферации и гибели опухолевых клеток при раке кожи, молочной железы и легких [27].

Определенный вклад в развитие окислительного стресса в опухолевых клетках вносят циклооксигеназа (COX) и липоксигеназа (LOX), благодаря активности которых образуются гидроперекиси полиненасыщенных жирных кислот с последующим превращением в высокореакционноспособные бифункциональные электрофилы — 4-гидроксиноненили и 4-оксо-ноненили, образующие сшивки в белках и ДНК [28]. Получены убедительные доказательства, подтверждающие роль катализируемого LOX метаболизма арахидоновой и линолевой кислот в развитии злокачественных новообразований. Образующийся уровень гидроперекисей жирных кислот в процессе метаболизма арахидоновой или линолевой кислоты влияет на регуляцию роста и выживаемость клеток, ангиогенез, клеточную инвазию, метастазирование и иммуномодуляцию. Обнаружено, что изоформа 12-LOX способствует прогрессированию и метастазированию РПЖ [29]. Активность изоформы 5-LOX также играет важную роль в выживании и пролиферации клеток РПЖ, поддерживая высокую экспрессию гена MYC [30].

Существенным источником АФК может служить активность оксидоредуктазы ERO1 (ER oxidoreductin 1), повышенная экспрессия гена которой отмечается во многих типах опухолевых клеток и которая, наряду с протеин-дисульфид-изомеразой (protein disulfide isomerase, PDI), играет основную роль в окислительных реакциях эндоплазматического стресса [31]. В окисленном состоянии PDI выступает в роли дисульфидного донора, в восстановленном — способна к изомеризации дисульфидных связей своих лигандов. Образовавшаяся после взаимодействия с неправильно свернутым белком, восстановленная форма PDI вновь окисляется при взаимодействии с ERO1, последующее окисление которой с использованием FAD как кофактора приводит к образованию H_2O_2 , которая может транспортироваться из ЭПР через аквапорин 8 [32].

Эффект Варбурга, связанный со значительной активацией анаэробного гликолиза, у большинства опухолевых клеток способствует

повышению внутриклеточного уровня АФК за счет снижения антиоксидантного статуса в результате подавления уровня образования пирувата и $\text{NADH}(\text{H}^+)$ с последующим снижением активности митохондриальной трансгидрогеназы и уровня $\text{NADPH}(\text{H}^+)$, что сопровождается снижением содержания в митохондриальном матриксе одного из основных низкомолекулярных антиоксидантов глутатиона (GSH) в результате подавления активности $\text{NADPH}(\text{H}^+)$ -зависимой глутатионредуктазы, восстанавливающей GSH из его окисленной формы (GSSG) [33]. Усиление гликолиза в определенной степени сдерживается благодаря гиперэкспрессии гена пируваткиназы M2, обладающей низкой каталитической активностью, что приводит к накоплению фосфоенолпирувата, частичному подавлению триозофосфатизомеразы и в результате — к активации пентозофосфатного пути (ПФП) [34]. Образующийся в результате повышенный уровень содержания $\text{NADPH}(\text{H}^+)$ сопровождается усилением генерации АФК благодаря активации изоформ NADPH -оксидазы, использующей $\text{NADPH}(\text{H}^+)$ в качестве кофермента. АФК и пируваткиназа M2 образуют отрицательную обратную связь, поддерживающую уровень АФК. Регулируемый АФК транскрипционный фактор HIF-1 α (hypoxia-inducible factor 1-alpha), в свою очередь, изменяет экспрессию генов, некоторые из которых связаны с эффектом Варбурга и сопутствующими ему путями. Обнаружено также, что PKM2 является коактиватором HIF-1 α , который, в свою очередь, регулирует протоонкоген Мус, контролирующий экспрессию генов, связанных с процессами клеточного роста и пролиферации [32, 34]. Изменения, связанные с энергетическим метаболизмом, могут быть связаны с экспрессией генов, регулируемых p53, включая *SCO2*, *TIGAR* и *PIG3* [35].

Повышение уровня АФК в опухолевых клетках также может быть результатом отсутствия регуляции генов антиоксидантных ферментов, опосредованной опухолевыми супрессорами. Примером может служить снижение экспрессии генов изоформ супероксиддисмутазы (*SOD2*), глутатионпероксидазы (*GPX1*) и сестрина (*SESN1*, *SESN2*) после инактивации гена-супрессора опухолевого роста *TP53* [5]. Возможны посттрансляционные модификации, в частности ацетилирование *SOD2* [36], которые придают антиоксидантным ферментам прооксидантные свойства.

Развитие хронического окислительного стресса в опухолевых клетках, определяемого в первую очередь высоким уровнем АФК,

приводит к определенному адаптивному изменению клеточного сигналинга, что сопровождается появлением так называемого «агрессивного» фенотипа опухолевых клеток. Рост АФК вызывает изменение активности фосфатаз PTP (protein tyrosine phosphatase), PTEN (phosphatase and tensin homolog) и MAPK (mitogen-activated protein kinase), тем самым усиливая сигнальные каскады MAPK/ERK (extracellular signal-regulated kinase), PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B)/Akt (RAC (Rho family)-alpha serine/threonine-protein kinase) и PKD (protein kinase D)/NF- κ B клеточно-специфическим образом [6]. Для поддержки пролиферативных преимуществ высоких уровней АФК при одновременном снижении риска апоптоза в опухолевых клетках активируются редокс-зависимые факторы транскрипции [3]. Согласно «реостатной» модели развития ответа на окислительный стресс, первый уровень защитного ответа на действие умеренных концентраций АФК обеспечивает активация Nrf2, более высокий уровень АФК вызывает «включение» транскрипционных факторов AP-1 и NF- κ B, дальнейшее повышение образования АФК активирует механизмы апоптоза [3].

Предполагается, что транскрипционный фактор p53, контролирующий клеточный цикл, старение и апоптоз, осуществляет финальный ответ на крайне высокие уровни АФК. Следует отметить, что при чрезмерном окислительном стрессе накопившийся в ядре избыточный Nrf2 может связываться с регуляторной областью промотора гена *Klf9* (Kruppel-like factor 9) и активировать его экспрессию, что приводит к подавлению экспрессии генов антиоксидантных ферментов путем связывания Klf9 с их репрессивными сайтами и вызывает клеточное повреждение в результате роста генерации АФК [37].

Повышение уровня АФК и последующее изменение антиоксидантной системы и редокс-статуса в целом может рассматриваться как важный регулятор клеточного гомеостаза в редокс-зависимой адаптации к хроническому окислительному стрессу, связанной с процессами инициации и прогрессирования злокачественных новообразований, что необходимо учитывать при разработке схем химиотерапии.

РОЛЬ NO В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ. РАЗВИТИЕ НИТРОЗАТИВНОГО СТРЕССА

У млекопитающих и человека оксид азота (NO) в основном синтезируется за счет

NO-синтазы, для которой известны три изоформы: две конститутивные NOS1 (нейрональная, nNOS) и NOS3 (эндотелиальная, eNOS), а также индуцибельная NOS2 (iNOS), обладающие примерно 50%-ной гомологией [38]. Активность конститутивных NOS1 и NOS3 регулируется в основном путем фосфорилирования, S-нитрозилирования, белок-белкового взаимодействия, изменения уровня кальция, благодаря чему во многом поддерживаются стационарные концентрации NO, обеспечивающие регуляцию тканевого гомеостаза [39]. Напротив, индуцибельная NOS2 осуществляет синтез высоких концентраций NO в ответ на действие различных факторов [39]. Кроме того, в матриксе и на внутренней мембране митохондрий обнаружена изоформа mtNOS – гомолог NOS1, исследование влияния которой на функционирование митохондрий интенсивно проводится в последнее время [40].

NOS представляет собой гомодимер, в котором мономеры связываются через тетраэдрический координационный комплекс иона цинка с четырьмя остатками Cys (по два из каждого мономера), располагающимися в них в аминокислотной последовательности CysXXXXCys. Все изоформы активны в виде гомодимеров, димеризация обеспечивается между двумя оксидазными доменами при участии Zn^{2+} с образованием тетратиольного комплекса, в котором от каждого мономера участвует два остатка цистеина. Благодаря этой последовательности NOS связывает субстрат L-аргинин и кофермент тетрагидробиоптерин (BH_4), который облегчает димеризацию, связывание субстрата и необходим для осуществления ферментативной реакции [39]. Каждый мономер содержит два домена: со стороны C-конца – редуктазный, со стороны N-кон-

ца – оксигеназный. Редуктазный домен связывает NADPH(H^+), FAD и FMN, участвующие в переносе электронов на оксигеназный домен соседнего мономера. За счет оксигеназного домена осуществляется димеризация и координируются ион цинка, BH_4 , гем и L-аргинин. Синтезируется NO из L-аргинина при участии кислорода через промежуточный продукт N- ω -гидрокси-L-аргинин с образованием L-цитруллина (рис. 1).

NO, помимо радикальной формы ($NO^\bullet$), может существовать в виде ионов нитрозония (NO^+) или нитроксила (NO^-), что зависит от условий микроокружения. Реакции, в которых участвует NO, можно разделить на две категории: прямые и непрямые [41, 42]. В первом случае NO напрямую реагирует с молекулой-мишенью. Напротив, в непрямых реакциях на первом этапе NO реагирует с кислородом или супероксидом с образованием АФА, которые впоследствии реагируют с биологическими мишенями. Прямые эффекты NO обычно осуществляются при его низких концентрациях, тогда как непрямые взаимодействия происходят при гораздо более высоких концентрациях.

В свою очередь, непрямые взаимодействия могут быть подразделены на две категории: нитрозативный и окислительный стресс [42]. В случае окислительного стресса, характеризующегося высоким уровнем АФК, и прежде всего $O_2^{\bullet-}$, в результате реакции NO с супероксидом образуются пероксинитрит ($ONOO^-$) и диоксид азота (NO_2), которые являются сильными окислителями. Напротив, в случае нитрозативного стресса при условии высокого уровня NO, образующийся в результате реакции NO с O_2 (автоокисление), а также в реакции $NO/O_2^{\bullet-}$, N_2O_3 является мягким окислителем, который предпочитает нитрозатные нуклеофилы, такие как амины и тиолы [43].

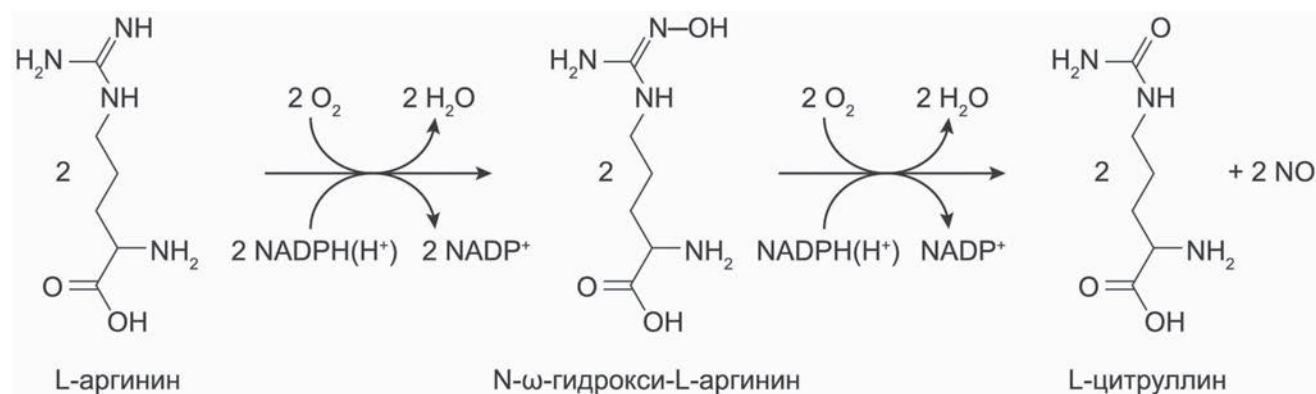


Рис. 1. Двухстадийная реакция, катализируемая NO-синтазой. На первом этапе L-аргинин гидроксилируется с образованием N-гидрокси-L-аргинина с использованием одной молекулы кислорода и двух электронов от NADPH(H^+). На втором этапе N-гидрокси-аргинин с использованием одного электрона от NADPH(H^+) и другой молекулы кислорода превращается в L-цитруллин и NO

Нитрозативный стресс подразумевает, как правило, взаимодействие нитрозония (NO^+) с тиолами, вторичными аминами или гидроксигруппами. Баланс между процессами окисления и нитрозирования во многом зависит от уровня NO.

Экспрессия NOS и уровень NO значительно варьируют в злокачественных новообразованиях и связаны как с проопухолевым, так и с противоопухолевым эффектами [44], что определяется концентрацией NO в среде, временем его воздействия и клеточной адаптацией к NO. Как правило, NO способствует выживанию и пролиферации клеток при низких концентрациях (<200 нМ), тогда как при более высоком уровне (>400 нМ) NO способствует аресту клеточного цикла, апоптозу и старению [45, 46]. Высокие концентрации NO приводят к образованию активных производных NO (N_2O_3 , ONNO^- , NO_2 , NO_2^-), которые вызывают повреждение ДНК, снижая активность ДНК-лигазы и повышая тем самым количество одонитевых разрывов, а также могут инактивировать белки репарации ДНК и служить источником генотоксичных нитрозаминов [47, 48]. Кроме того, цитотоксическое действие NO связано с его способностью подавлять активность белков дыхательной цепи митохондрий путем связывания с FeS-кластерами [49].

Поэтому высокие концентрации NO, продуцируемые, в частности NOS2, потенциальным цитостатическим/цитотоксическим фактором действия иммунной системы, могут оказывать противоопухолевое действие, тогда как хроническая индукция NOS2 способствует активации опухолевого роста [50]. Кроме того, низкие концентрации NO, продуцируемые NOS1 и NOS3, ускоряют прогрессирование опухоли путем модулирования ангиогенеза, апоптоза, клеточного цикла, инвазии и метастазирования [51].

Аберрантная экспрессия гена *NOS1* обнаружена в опухолях головного мозга, легких и глиоме [46]. Установлено, что низкие уровни NO, образуемого NOS1, запускают пролиферацию в первую очередь через механизм, связанный с cGMP, образованный цитозольной гуанилатциклазой [52]. Клеточные линии карциномы яичника (OVCAR3, SKOV3, ES-2) характеризуются высоким уровнем экспрессии *NOS1*, что связано с усилением пролиферации, инвазии и химиорезистентности опухолевых клеток [46].

Недавние исследования показали, что NOS3 может служить маркером отрицательного прогноза при злокачественных новообразованиях,

так как экспрессия *NOS3* также коррелирует с процессами инвазии, метастазирования, ангиогенеза и резистентности [53, 54]. Установлено, что ген *NOS3* высокоэкспрессирован в различных фенотипах клеток колоректального рака, включая низкодифференцированные аденокарциномы, что позволило предложить использовать NOS3 как возможный новый биомаркер при прогностически неблагоприятных колоректальных злокачественных новообразованиях [53].

В результате ряда клинических испытаний установлено, что экспрессия гена *NOS2* связана со значительным числом злокачественных новообразований, включая рак молочной железы, печени, шейки матки, яичников, предстательной железы, носоглотки, легких, желудка, поджелудочной железы, толстой кишки и пищевода, меланому, глиому [55]. Высокий уровень NOS2, как и маркера воспаления COX-2, отмечается во многих типах опухолей, при этом отмечается, что повышение экспрессии *NOS2* является отрицательным прогностическим маркером для пациентов с раком молочной железы, поджелудочной железы, желудка, печени, толстой кишки, глиомы и меланомы, коррелирующих с ростом метастатического потенциала. Кроме того, обнаружено, что трансфекция *NOS2* в опухолевые клетки приводит к более агрессивным опухолям *in vivo*, несмотря на то что *in vitro* они менее пролиферативны [56]. Установлено существование связи между уровнями NO и p53, отражающей тот факт, что p53 может подавлять экспрессию *NOS2*, тогда как высокие уровни NO приводят к повышению стабилизации p53 посредством фосфорилирования остатков Ser/Thr, а также накоплению p53 в клетке, что приводит к остановке клеточного цикла и инициации апоптоза [56, 57].

Роль NO в онкогенезе (при $\text{NO} < 200$ нМ) определяется его участием в ряде механизмов, связанных с инициацией и прогрессированием опухолевого роста: путем активации повреждения и подавления репарации ДНК, активации онкогенов, подавления апоптоза, активации генных мутаций при хронических и злокачественных состояниях (накопление мутантного p53) и появления посттрансляционной модификации белков, изменяющих их функциональное состояние (S-нитрозилирование, нитрование Tyr) [54]. Кроме того, NO используется в сигналинге, связанном со злокачественной трансформацией, включая Wnt-, Ras-, ERK-, Akt-, циклин D1-, mTOR-зависимые пути и участвуя в процессах ангиогенеза, эпителиально-мезенхимального перехода

и метастазирования [58]. Кроме того, в низких концентрациях NO подавляет запуск апоптоза, вызывая гиперэкспрессию антиапоптотических белков Bcl-2 и Bcl-xL и ингибирование каспаз [59]. Напротив, продолжительная гиперпродукция NO действует как проапоптотический модулятор, активируя каспазы путем высвобождения митохондриального цитохрома *c* в цитоплазму, вызывая повышение экспрессии генов *TP53*, *p38 MAPK* и снижение экспрессии генов белков семейства Bcl-2 [60].

S-ГЛУТАТИОНИЛИРОВАНИЕ. РЕГУЛЯЦИЯ РЕДОКС-ГОМЕОСТАЗА В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ

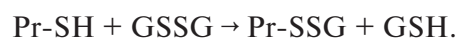
Изменение редокстаза в опухолевых клетках сопровождается редокс-зависимым изменением посттрансляционной модификации белков, в большой степени благодаря модификации наиболее чувствительных к уровню АФК/АФА остатков Cys. Хотя в процентном отношении в белках количество остатков Cys не превышает 3% [9], они являются одними из наиболее чувствительных к окислительной модификации аминокислотных остатков и в большой степени связаны с редокс-зависимой регуляцией функциональной активности белков, поскольку остатки Cys принимают участие в формировании третичной и четвертичной структуры и входят в состав активных центров. В этой связи высокосignификантными редокс-зависимыми посттрансляционными модификациями белков являются S-глутатионилирование и S-нитрозилирование остатков Cys.

Значение pK_a SH-группы остатка Cys определяется структурой его микроокружения и может значительно варьировать (от 3,5 до >12). Обычно при физиологическом значении pH (7,0–7,4) pK_a приблизительно составляет 8,5. Снижение pK_a может быть вызвано стабилизацией тиолат-аниона ($Pr-S^-$) электроноакцепторными группами или соседним положительным зарядом, напротив, pK_a тиолата повышается в присутствии отрицательно заряженных групп или внутри гидрофобных складок белка [10]. Так, в непосредственной близости от остатков основных аминокислот (His, Lys и Arg) pK_a SH-группы снижается (обычно до 5,0–7,0), и при физиологическом pH такие сульфгидридные группы будут диссоциированы. Образующиеся тиолат-анионы являются эффективными нуклеофилами, и их реакционная способность по отношению к электрофильным мишеням значительно увеличивается [61].

S-Глутатионилирование представляет собой обратимую посттрансляционную модификацию SH-групп остатков Cys белков с последующим повышением как молекулярной массы, так и отрицательного заряда (за счет остатка Glu) благодаря связыванию с глутатионом (GSH), что приводит не только к защите остатков Cys от окислительного повреждения, но и к редокс-зависимому изменению конформации и функциональной активности белков [10].

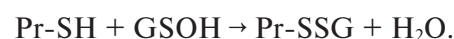
Пул тиолов белка находится в динамическом состоянии равновесия с пулом глутатиона и может служить буфером для регенерации GSH. S-Глутатионилирование белков происходит как спонтанно, так и ферментативно [11].

Неферментативные реакции S-глутатионилирования могут протекать в ходе тиол-дисульфидного обмена при участии тиола белка ($Pr-SH$) и окисленного глутатиона GSSG:



Константа равновесия реакции K_{mix} выражается отношением $[Pr-SSG] \times [GSH] / [Pr-SH] \times [GSSG]$, следовательно, доля глутатионилированного белка ($[Pr-SSG] : [Pr-SH]$) сильно зависит от локального соотношения $[GSH] : [GSSG]$ [62]. Глутатионилирование белка примерно на 50% ($K_{mix} \sim 1$; $[Pr-SSG] : [Pr-SH] = 1$) может произойти при очень сильном падении этого соотношения (с 100 : 1 до 1 : 1). Для образования значительного количества Pr-SSG необходим значительный сдвиг соотношения GSH/GSSG в сторону GSSG. Такой резкий сдвиг маловероятен при нормальных физиологических условиях, за исключением тяжелого окислительного стресса, что означает, что этот механизм не служит основным путем глутатионилирования [63]. Во многих типах опухолевых клеток отмечается рост GSH/GSSG благодаря индукции синтеза GSH и восстановления GSSG в результате повышения уровня образования NADPH(H^+) вследствие активации ПФП [64], что отмечается как адаптивный ответ на окислительный стресс. Кроме того, низкие значения констант скорости второго порядка для реакции различных тиолов с GSSG ($4,9 \times 10^2$ – $1,2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) [65] делают тиол-дисульфидный обмен маловероятным событием.

Образование глутатионилированного белка возможно также в результате его взаимодействия с окисленной формой глутатиона в виде сульфеновой кислоты (GSOH):



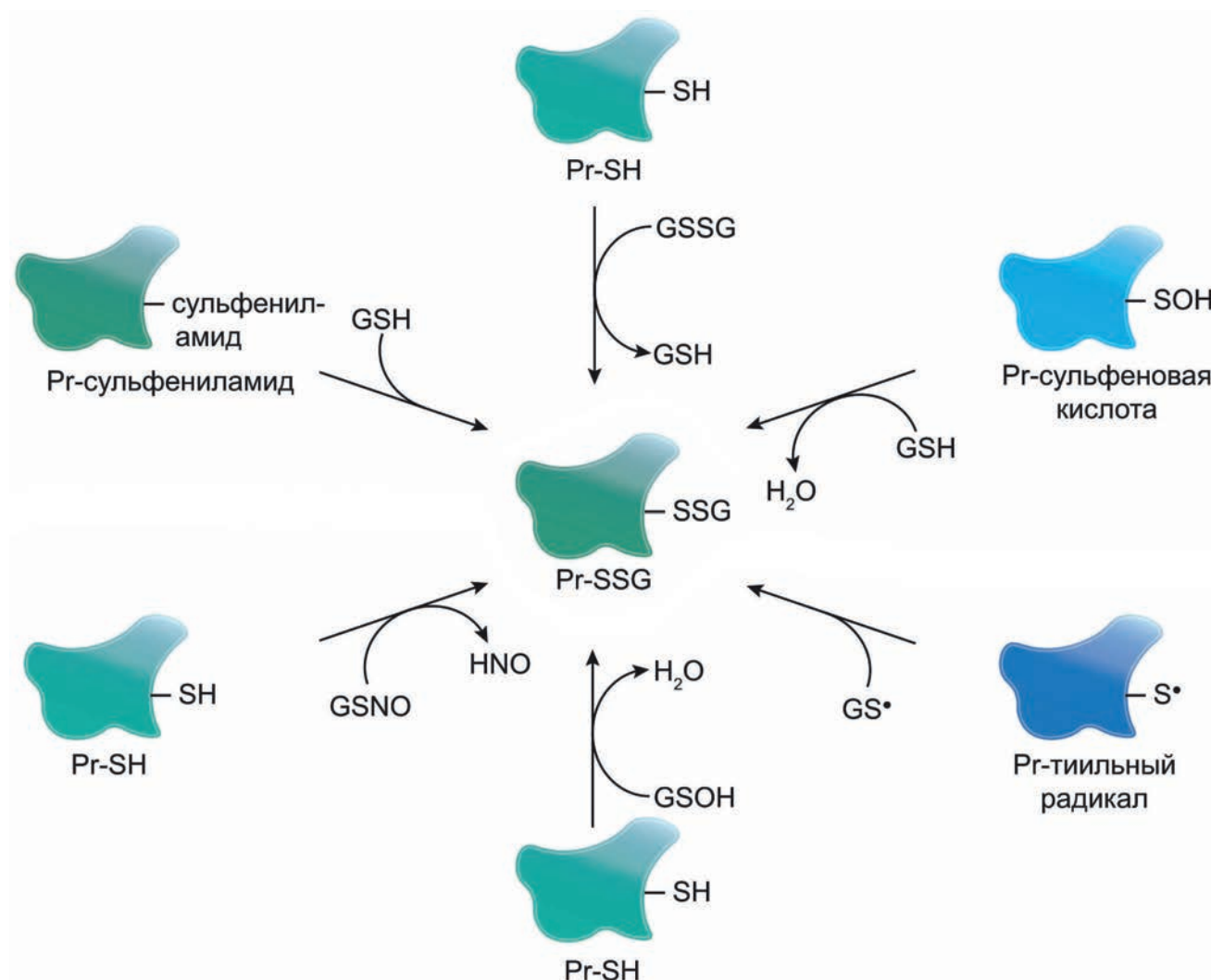
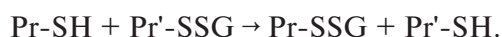


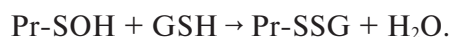
Рис. 2. Механизмы спонтанного S-глутатионилирования

Кроме того, возможен вариант тиол-ди-сульфидного обмена между Pr-SH и белком, который уже S-глутатионилирован (Pr'-SSG):



S-Глутатионилирование может происходить при взаимодействии Pr-SH или GSH с окисленным производным остатка цистеина белка, например, сульфеновой кислотой (-SOH), тиильным радикалом (-S•), S-нитрозилем (-SNO), тиосульфатом (-S(O)SR) или сульфениламидом (циклический-S-N-CO-) (рис. 2).

При окислительном действии АФК на Pr-SH (например, H_2O_2) образуется сульфеновая кислота (Pr-SOH), которая затем быстро реагирует с GSH с образованием Pr-SSG:

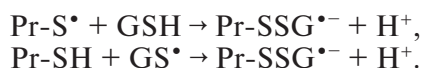


В микромолярных концентрациях H_2O_2 окисление SH-групп белка протекает быстро:

сульфеновая кислота нестабильна и может подвергаться дальнейшему окислению до сульфиновой (Pr-SO₂H) и в итоге до сульфоновой кислоты (Pr-SO₃H), образование которой приводит, как правило, к необратимой дезактивации белка. Таким образом, S-глутатионилирование сульфеновой кислоты может предотвратить дальнейшее окисление белка по остатку цистеина [66]. В физиологических условиях внутриклеточный уровень H_2O_2 находится в субмикромолярном диапазоне (10^{-9} – 10^{-7} М) [67], поэтому спонтанное S-глутатионилирование *in vivo* по этому механизму будет происходить довольно медленно. Однако в опухолевых клетках развитие окислительного стресса сопровождается повышенной генерацией H_2O_2 . Следует также отметить, что образование сульфеновой группы в белках является редким событием благодаря высокой активности GPx1 и пероксиредоксина (Prx), имеющих более высокие константы скорости второго порядка для реакции восстановления H_2O_2

по сравнению с взаимодействием H_2O_2 с белковыми остатками Cys [68]. В то же время локальная инактивация пероксидаз, приводящая к высоким уровням H_2O_2 , может способствовать сульфенилированию тиолов.

Одноэлектронное окисление белкового тиола или GSH, например, гидроксильным радикалом ($\cdot\text{OH}$), приводит к образованию белкового тиильного радикала ($\text{Pr-S}^\bullet$) или тиильного радикала глутатиона ($\text{GS}^\bullet$), которые способны образовывать глутатионилированный радикальный интермедиат ($\text{Pr-SSG}^{\bullet-}$) при взаимодействии с GSH или Pr-SH соответственно:



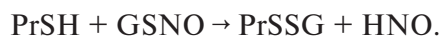
Далее, в результате взаимодействия $\text{Pr-SSG}^{\bullet-}$ с молекулярным кислородом образуется супероксид и Pr-SSG. Тиильные радикалы образуются в условиях окислительного или нитрозативного стресса и являются одними из самых короткоживущих активированных тиолов [69]:



Возможен крайне редкий вариант прямого образования Pr-SSG при взаимодействии одновременно двух радикалов $\text{Pr-S}^\bullet$ и $\text{GS}^\bullet$:



Действие NO может вызывать спонтанное S-глутатионилирование. NO является слабым тиоловым окислителем, однако как S-глутатионилирование, так и S-нитрозилирование (см. ниже) можно стимулировать за счет вторичного образования АФА. Так, действие противоопухолевого агента PABA/NO (O^2 -[2,4-динитро-5-(N-метил-N-4-карбоксифениламино)фенил]1-(N,N-диметиламино)диазен-1-иум-1,2-диолата) на клетки аденокарциномы SKOV3 и промиелоцитарного лейкоза HL60 вызывает дозозависимое повышение внутриклеточного уровня NO с последующим развитием нитрозативного стресса, наряду с высоким уровнем S-глутатионилирования белков, включая β -лактатдегидрогеназу, ингибитор диссоциации RhoGDP β , АТФ-синтазу, фактор элонгации 2, PDI, нуклеофосмин-1, шаперонин, актин, протеинтирозинфосфатазу 1B (protein tyrosine phosphatase 1B), глюкозидазу II [70]. Следует отметить, что при взаимодействии с тиолами нитрозоглутатион (GSNO) также может приводить к S-глутатионилированию [71]:



На примере тирозинфосфатазы 1B показано, что образование Pr-SSG, как промежуточного интермедиата, может происходить при восстановлении сульфенил-амида, циклической структуры, содержащей фрагмент -S-N-CO- и формирующейся в условиях сильного окислительного стресса с участием остатка Cys215 в активном центре фермента [72].

Реакции неферментативного S-глутатионилирования неспецифичны и интенсивно протекают в условиях стресса. Однако скорость и масштабы этого процесса значительно возрастают при участии ферментов, среди которых лидирующее значение принадлежит изоформе глутатион S-трансферазы P1-1 (GSTP1-1), экспрессия гена которой имеет высокое прогностическое значение для широкого ряда злокачественных новообразований [73, 74]. Кроме того, высокая экспрессия *GSTP1* связана с развитием лекарственной устойчивости опухолевых клеток, связанным с редокс-зависимым механизмом, подавлением путей активации апоптоза и цитотоксичности противоопухолевых препаратов (доксорубицина, цисплатина) [75].

Пероксиредоксины (Prx), семейство тиол-специфических пероксидазных ферментов, повышение экспрессии генов которых отмечается в различных типах опухолей [76], являются известными мишенями для GSTP1-опосредованного обратимого глутатионилирования [77]. Каталитический цистеин в ферменте Prx подвержен окислению и при восстановлении субстрата (H_2O_2) утрачивает пероксидазную активность. GSTP1 способствует глутатионилированию ранее окисленного остатка цистеина, тем самым восстанавливая активность Prx. Субстратами для глутатионилирования являются два основных подкласса Prxs — 1-cys Prx (также известный как Prx6) и 2-cys Prx [77]. Каталитически активный остаток Cys47 скрыт в гидрофобном ядре Prx6, субстратами являются как H_2O_2 , так и гидропероксиды фосфолипидов. После восстановления пероксида окисленный Cys47 получает доступ к GSH-нагруженному GSTP1 для реактивации Prx6 [78]. Активация Prx6 происходит при формировании гетеродимера с GSTP1-1, что способствует глутатионилированию Cys47 Prx6, вследствие чего происходят конформационные изменения гетеродимера, обеспечивающие формирование дисульфидной связи между Cys47 GSTP1-1 и Cys47 Prx6, за чем следует восстановление дисульфида при участии GSH и регенерация Cys47 Prx6. Убедительные данные свидетельствуют о том, что разные полиморфные формы GSTP1 могут

по-разному опосредовать активацию *Ptxb* и, таким образом, влиять на его реакцию на уровень АФК. *GSTP1-1A*, наиболее распространенная полиморфная форма *GSTP1*, имеет более высокое сродство к *Ptxb* по сравнению с *GSTP1-1B* или *-1D* [79]. Более того, клетки рака молочной железы, трансфицированные *GSTP1A*, показали значительно более высокую пероксидазную активность, чем клетки, трансфицированные *GSTP1B* [79]. Различия в активности могут быть связаны с изменением относительного расстояния между окисленным Cys47 и активированным GSH, связанным с молекулой *GSTP1* в различных полиморфных формах.

Интересно, что *GSTP1-1* является редокс-зависимым ферментом, ингибирование которого вызывает глутатионилирование по остаткам Cys47 и Cys101, приводя к разрыву его связывания с JNK1 (с-Jun N-terminal kinases 1) [73]. Прямое белок-белковое взаимодействие *GSTP1-1* с JNK1 ингибирует активность киназы, ослабляя индуцированные JNK ответы на стресс и апоптоз. Следовательно, окислительный стресс, вызывая инактивацию *GSTP1-1*, активирует JNK.

Рост экспрессии *GSTP1* в опухолевых клетках может способствовать онкогенезу посредством глутатионилирования и ингибирования такого онкосупрессора, как p53, который играет ключевую роль в репарации ДНК, контроле клеточного цикла, дифференцировке и подавлении роста опухоли [80]. Так, высокий уровень глутатионилированного p53 обнаружен в клетках аденокарциномы предстательной железы и меланомы [81], чему может способствовать также действие окислительного стресса и повреждение ДНК.

S-Глутатионилирование может способствовать активации транскрипционного фактора Nrf2, контролирующего экспрессию генов ферментов систем детоксикации и антиоксидантной защиты [82, 83]. Следует отметить, что при чрезмерном окислительном стрессе накопившийся в ядре избыточный Nrf2 может связываться с регуляторной областью промотора гена *Klf9* и активировать его экспрессию, что приводит к подавлению экспрессии генов антиоксидантных ферментов путем связывания Klf9 с их репрессивными сайтами и вызывает клеточное повреждение в результате роста уровня АФК [37]. В нормальных условиях Nrf2 связан в цитоплазме с Keap-1 (Kelch-like ECH-associated protein 1), который ограничивает активность Nrf2. Ингибирование Nrf2 является нормальной стратегией эффективного лечения злокачественных новообразований.

Однако недавние исследования показали, что не только ингибиторы, но и активаторы Nrf2 способны индуцировать апоптоз опухолевых клеток [84, 85], что создает новое направление для противоопухолевой терапии. Несмотря на существование большого количества активаторов Nrf2, немногие из них могут способствовать апоптозу клеток. Таким образом, поиск препаратов, активирующих Nrf2 и способствующих клеточному апоптозу, стал новой идеей для лечения опухолей. Таким подходом может служить активация S-глутатионилирования. Так, на immortalized клетках карциномы шейки матки HeLa установлено, что использование 2-(7-(диэтиламино)-2-оксо-2H-хромен-3-ил)циклогекса-2,5-диен-1,4-диона, истощающего уровень GSH, приводит к усилению S-глутатионилирования Keap-1 с последующей активацией ядерной транслокации Nrf2, что вызывает усиление транскрипции гена *p53*, снижает внутриклеточный уровень Bcl2 и, напротив, повышает содержание Bax с последующей активацией апоптоза опухолевых клеток [86].

Важную роль в пролиферации, инвазии, онкогенезе и метастазировании опухоли играют изоформы протеинкиназы C (PKC) [87], гиперэкспрессия генов которых связана с развитием опухолевого роста за счет синергетической активации нескольких путей клеточного выживания и митоза, включая NF- κ B-, Stat3 (signal transducer and activator of transcription 3)-, PI3K/Akt-, ERK-зависимый сигналинг [88, 89]. Обнаружено, что изоформы PKC (α , β , γ , ϵ , ζ) инактивируются в результате окислительного S-глутатионилирования, что, в частности, показано с использованием диамида и GSH [90].

Мишенями для S-глутатионилирования является чрезвычайно широкий ряд белков, участвующих практически во всех областях жизнедеятельности опухолевых клеток. В частности, глутатионилирование ингибирует активность различных ферментов, участвующих в энергетическом обмене, включая NADH-дегидрогеназу, цитохромоксидазу, АТФ-азу, пируватдегидрогеназу, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу (GAPDH) [74]. Подавляя активность пируваткиназы M2 и бифункционального фермента, образующего фруктозо-2,6-бисфосфат, S-глутатионилирование способствует усилению ПФП и повышению образования NADPH(H^+), что способствует росту уровня GSH за счет усиления активности глутатионредуктазы, восстанавливающей GSSG с использованием NADPH(H^+) в качестве кофермента [91, 92]. S-Глутатионилирование

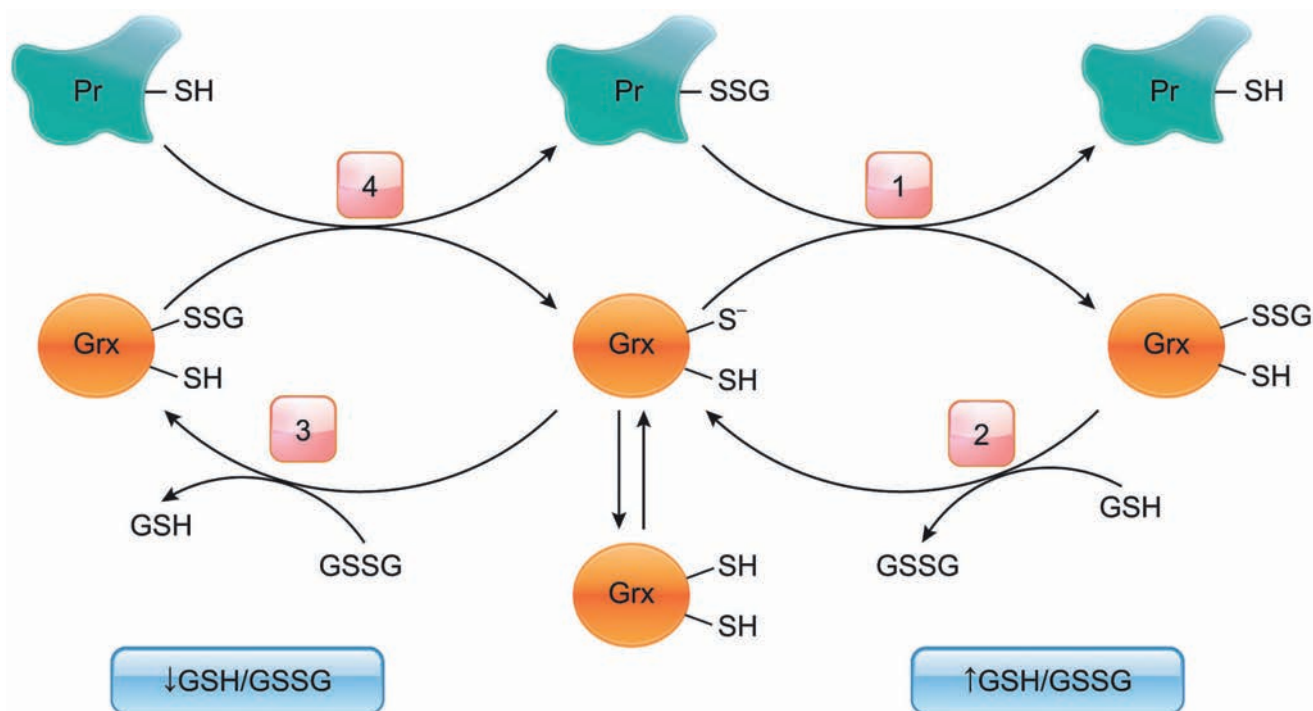


Рис. 3. Каталитический механизм глутаредоксина в зависимости от соотношения GSH/GSSG. При повышенном уровне GSH/GSSG Grx катализирует деглутатионирование белков: (1) глутатионированный белок (Pr-SSG) подвергается атаке тиолат-аниона фермента (Grx-S^-) с образованием восстановленного белка (Pr-SH) и интермедиата (Grx-SSG), который далее (2) восстанавливается с помощью GSH, образуя активный Grx-SH и GSSG. При снижении соотношения GSH/GSSG Grx катализирует S-глутатионирование: S-глутатионированный Grx (Grx-SSG), образующийся в реакции с GSSG (3), реагирует с белком с образованием S-глутатионированного белка (Pr-SSG) (4)

модулирует активность внутриклеточных сигнальных путей, изменяя активность многих белков, в частности, киназ Akt и MEKK1 (mitogen-activated protein kinase kinase 1), протеинтирозинфосфатазу 1B, Ras-белков. S-Глутатионирование H-Ras по остатку Cys118 модулирует его GTP-азную активность, вызывая активацию нижестоящих p38 и Akt [93]. Важный медиатор апоптоза каспаза-3, как и ее предшественник прокаспазы-3, подвергаются S-глутатионированию. S-Глутатионирование прокаспазы-3 ингибирует ее способность подвергаться протеолитической активации. Глутатионирование каспазы-3 по остатку Cys135 белковой субъединицы p17, присутствующему в активном центре, влияет на доступ субстрата, снижая активность фермента [94].

Процесс S-глутатионирования является обратимой посттрансляционной модификацией, и, как правило, деглутатионирование протекает ферментативно и более тщательно регулируется по сравнению с S-глутатионированием. Одним из наиболее эффективных ферментов, восстанавливающих Pr-SSG, являются изоформы глутаредоксина (Grx1 и Grx2). Следует отметить, что в зависимости от вели-

чины соотношения GSH/GSSG Grx может не только осуществлять деглутатионирование, но и, напротив, способствовать S-глутатионированию (рис. 3) [95]. При снижении GSH/GSSG и повышении концентрации H_2O_2 Grx2 функционирует как глутатионирующий фермент, например, в отношении дыхательного комплекса I, тогда как при высоком уровне GSH/GSSG и низкой концентрации H_2O_2 Grx2 обладает деглутатионирующей активностью. Такая зависимость процессов S-глутатионирования/деглутатионирования, катализируемых Grx, от клеточного редокс-статуса может быть возможной адаптацией, гарантирующей, что события S-глутатионирования не будут обращены вспять, пока сохраняется окислительный стресс [96, 97].

Механизм S-глутатионирования, катализируемый Grx, протекает в несколько стадий. Сначала идет нуклеофильная атака тиолат-анионом Grx-S^- дисульфидной связи GSSG, что приводит к образованию глутатионированного интермедиата Grx-SSG, с которого происходит перенос активированного катионного радикала $[\text{GS}^\bullet]^+$ на белок-мишень с образованием Pr-SSG, при этом Grx опять способен к катализу. Для данного процесса

отмечается также возможность обратимого образования Grx-S₂ из Grx-SSG [96]. При деглутатионилировании белок (Pr-SSG) подвергается атаке тиолат-аниона фермента (Grx-S⁻), образуя ковалентный интермедиат (Grx-SSG) с высвобождением восстановленного белка (Pr-SH). На втором этапе, определяющем скорость деглутатионилирования, происходит восстановление Grx-SSG с помощью GSH с образованием GSSG.

Сульфиредоксин (Srx) играет преимущественную роль в деглутатионилировании некоторых белков (Prx1, актин, PTP1B), возможно, из-за его более высокого сродства к таким белкам по сравнению с Grx. В отличие от Grx, Srx, вероятно, не инактивируется окислительным стрессом, как это видно из его способности снижать уровень S-глутатионилирования при росте АФК [98]. Механизм деглутатионилирования, катализируемый Srx, имеет сходство с механизмом, катализируемым Grx, и включает образование глутатионилированного по консервативному остатку Cys99 промежуточного интермедиата Srx-SSG [99]. Деглутатионилирование, катализируемое Srx, по-видимому, имеет широкую субстратную специфичность. На клетках HEK293 с трансфекцией Srx продемонстрировано снижение общего содержания S-глутатионилированных белков, образующихся в условиях нитрозативного стресса после обработки донором оксида азота PABA/NO [98].

На эпителиальных клетках рака молочной железы T47-D показано, что способностью катализировать реакцию деглутатионилирования обладает изоформа глутатионтрансферазы GSTO1-1 [100, 101], которая имеет структурное сходство с Grx, включая Trx-подобную укладку и сайт связывания GSH, где он может образовывать дисульфидную связь с консервативным остатком Cys32 активного центра. Другие изоформы GST, включая GSTA, GSTM, GSTP, GSTT, GSTS и GSTZ, напротив, имеют каталитические остатки Tyr или Ser. GSTO1-1 катализирует деглутатионилирование в два этапа, подобно Grx: сначала Cys32 активного центра GSTO1-1 взаимодействует с Pr-SSG, в результате образуются восстановленный Pr-SH и смешанный дисульфид GSTO1-1-Cys32-SG, который затем деглутатионилируется при участии GSH с образованием GSSG и функционально активной GSTO1-1.

Способность к деглутатионилированию белков обнаружена и у PDI, активация которых наблюдается при различных видах злокачественных новообразований (рак почки, легких, предстательной железы, меланома) и гиперэкспрес-

сия генов которых часто коррелирует с метастазированием и инвазивностью опухоли, химио-резистентностью и более низкой выживаемостью онкологических больных [102, 103]. Однако пока не ясна значимость вклада PDI в этот процесс, поскольку их основной функцией является обмен дисульфидными связями, локализованными в структуре PDI и в белках-мишенях. Располагаясь в ЭПР, PDI катализирует окисление новых формирующихся белков и участвует в изомеризации белков с неверно сформированными дисульфидными связями, добиваясь построения их нативной структуры, кроме того, PDI может секретироваться клеткой или ассоциироваться с поверхностью клетки для поддержания белков в восстановленном состоянии.

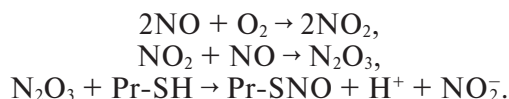
S-НИТРОЗИЛИРОВАНИЕ. РЕГУЛЯЦИЯ РЕДОКС-ГОМЕОСТАЗА В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ

Обратимой посттрансляционной модификацией тиоловых групп белков, наряду с S-глутатионилированием, служит S-нитрозилирование [4].

Как правило, для S-нитрозилирования тиольных групп цистеина необходимо одноэлектронное окисление, которое происходит с участием O₂ либо иона переходного металла, например железа или меди [104]. Вариант возможного прямого присоединения NO случается достаточно редко с участием тиольного радикала:



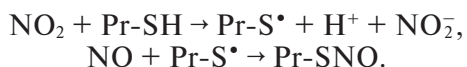
При взаимодействии NO с O₂ образуется набор оксидов с более высокой степенью окисления азота (так называемое аутоокисление), среди которых N₂O₃ рассматривается как главный нитрозилирующий агент, способствующий появлению нитрозотиола белка и нитрита. Скорость этой реакции существенно увеличивается в гидрофобных средах, таких как мембраны, где локализована NOS3 [104]:



Одним из возможных механизмов синтеза GSNO является взаимодействие GSH с N₂O₃:

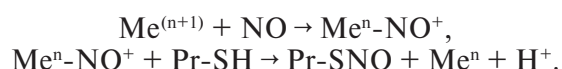


Возможен вариант взаимодействия NO_2 с тиолом с образованием тиильного радикала и дальнейшей его реакции с NO :



Оба варианта ограничены по скорости на этапе образования NO_2 , а также доступностью NO .

Описан вариант S-нитрозилирования, катализируемого ионами переходных металлов (Fe^{3+} или Cu^{2+}), при этом происходит одноэлектронное окисление NO , а образующийся нитрозоний (NO^+) может нитрозилировать тиол, располагающийся в непосредственной близости:



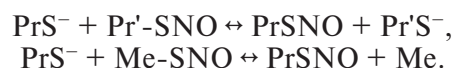
Такой механизм имеет место при аутонитрозилировании гемоглобина и при образовании GSNO с участием церулоплазмينا и цитохрома *c* [104].

Следует отметить, что S-нитрозилирование может осуществляться только по определенным остаткам Cys белков. Целевой остаток Cys должен находиться: а) в непосредственной близости от источника образования NO , б) в белковом мотиве I/L-X-C-X₂-D/E, который специфически распознается NOS, в) в высокогидрофобной области, образованной третичной белковой структурой или мембранами, г) в подходящем микроокружении с необходимыми свойствами для образования тиолят-аниона [105].

Согласно этим условиям первыми мишенями S-нитрозилирования являются изоформы NOS, генерирующие NO [106]. Так, S-нитрозилирование NOS3 ингибирует ее димеризацию и, таким образом, активацию фермента. Последнее предполагает, что S-нитрозилирование конститутивной NOS может служить механизмом самовыключения [106]. Мотив I/L-X-C-X₂-D/E должен находиться внутри α -спирали, образуя большую площадь поверхности, чтобы повысить доступность NO [107]. Кроме того, в рамках мотива S-нитрозилирования целевой тиол остатка Cys должен электростатически взаимодействовать с соседними заряженными остатками ($<6 \text{ \AA}$), что увеличивает его нуклеофильность, способствуя образованию тиолят-аниона. S-Нитрозилирование белков также предпочтительно идет по Cys-остаткам в гидрофобных областях, в которые легко могут проникать NO и молекулярный кислород и где скорость их реакции возрастает

в 30–300 раз [108]. В окружении остатков-мишеней Cys (в пределах $8 \text{ \AA}$) должно быть небольшое количество объемных, стерически затрудненных остатков аминокислот (Phe, Tyr, Arg, Leu), наличие которых препятствует взаимодействию с NO [109].

Хотя S-нитрозилирование происходит только с определенными остатками Cys, такая селективность может частично устраняться с помощью *транс*-нитрозилирования. При *транс*-нитрозилировании низкомолекулярный нитрозотиол (например, GSNO) или белок, нитрозилированный по остатку Cys или содержащий нитрозилированный ион металла (например, в геме), взаимодействует с белком, подвергаясь S-нитрозилированию, и передает нитрозо-группу (ON-) на остаток Cys этого белка:



Такой перенос способствует последовательной удаленной передаче NO от места его синтеза, включая перенос NO между разными субклеточными структурами [110]. *Транс*-нитрозилирование происходит при условии, что два белка непосредственно взаимодействуют и обладают соответствующими окислительно-восстановительными потенциалами, обеспечивающими перенос электрона с последующим переносом NO [110]. Предполагается, что физическая ассоциация двух белков вызывает конформационное изменение, позволяя реципиентному тиолу образовывать тиолят-анион, который затем атакует нитрозильную группу донора [110].

GSNO является наиболее распространенным S-нитрозотиолом и основным эндогенным донором NO , легко образующимся в митохондриях при переносе нитрозильной группы с железа гема цитохрома *c* на GSH и *транс*-нитрозилирующим широкий спектр белков, включая хорошо известные в клеточном сигналинге NF- κ B, STAT3, AKT, EGFR [111, 112]. Опосредованное GSNO *транс*-нитрозилирование субъединиц p65 и p50 NF- κ B, а также киназы I κ B ингибирует активацию NF- κ B, которая тесно связана с развитием злокачественных новообразований [113]. STAT3, способствующий выживанию и пролиферации клеток, также подвергается *транс*-нитрозилированию с помощью GSNO, что приводит к подавлению фосфорилирования STAT3, необходимого для его активации [114]. GSNO может индуцировать апоптоз в клетках рака легкого посредством нитрозилирования Prx2

по сайтам Cys51 и Cys172, вызывающего нарушение образования димера и подавление его антиоксидантной активности, что приводит к накоплению эндогенной H_2O_2 с последующей активацией AMPK. Активированная AMPK фосфорилирует SIRT1 и тем самым ингибирует его деацетилирующую активность по отношению к p53 в клетках аденокарциномы легкого A549 и FOXO1 в клетках немелкоклеточного рака легких NCI-H1299 [115]. В доклинических исследованиях отмечается противоопухолевое действие GSNO, связанное с подавлением опухолевого роста и повышением эффективности лучевой терапии [112]. Следует отметить, что сравнение противоопухолевой активности GSNO и би- и моноядерных динитрозильных комплексов железа с различными тиолсодержащими лигандами на модели трансплантируемых солидных опухолей мышей позволило установить, что наибольшую активность (ингибирование роста опухолевых клеток на 90%) оказывают динитрозильные комплексы железа с GSH, что связано с их способностью выступать в качестве доноров нитрозония [116].

Значительную роль в *транс*-нитрозилировании играет фермент GAPDH, катализирующий превращение глицеральдегид-3-фосфата в D-глицерат-1,3-бисфосфат. Как *транс*-нитрозилаза, GAPDH участвует в регуляции транскрипции и механизма апоптоза [117,118]. GAPDH перемещается из цитозоля в ядро при S-нитрозилировании по остатку Cys150 в активном центре с помощью белка S100A8/A9, S-нитрозилированного, в свою очередь, в результате повышенной активности NOS2 в ответ на стресс [107, 118]. S-Нитрозилирование GAPDH делает возможным ее взаимодействие с убиквитинлигазой E3 Siah1, образующийся комплекс GAPDH–Siah1 перемещается в ядро, где Siah1 опосредует убиквитинирование и деградацию ядерных белков, что приводит к активации апоптоза. GAPDH также может *транс*-нитрозилировать белки, участвующие в транскрипции и репарации ДНК, включая деацетилазы – сиртуин-1 (sirtuin-1, SIRT1) и гистондеацетилазу 2 (histone deacetylase 2, HDAC2), активность которых ингибируется S-нитрозилированием, а также белок репарации ДНК – ДНК-зависимую протеинкиназу, которая, напротив, активируется за счет S-нитрозилирования [118]. Кроме того, GAPDH участвует в активации p53-опосредованного апоптоза в результате образования комплекса с p53 [117]. В ответ на стресс GAPDH также перемещается в митохондрии для *транс*-нитрозилирования митохондриальных белков,

таких как Hsp60, ацетил-KoA-ацетилтрансфераза (acetyl-CoA acetyltransferase, ACAT1) и потенциал-зависимый анионный канал 1 (voltage dependent anion channel 1, VDAC1) [119]. Повышение GAPDH-опосредованного *транс*-нитрозилирования митохондриальных белков регулирует проницаемость митохондриальной мембраны, функциональную активность митохондрий и гибель клеток [120]. В опухолевых клетках нарушается GAPDH-опосредованное *транс*-нитрозилирование ядерных белков, что приводит к нарушению стресс-зависимого апоптоза [118], одной из причин которого является подавление Siah1, которое облегчает ядерную транслокацию GAPDH [114]. Экспрессия Siah1 напрямую регулируется опухолевым супрессором p53, подавленным при многих типах рака [121].

Функцию *транс*-нитрозилаз могут выполнять кальций- и цинк-связывающие белки S100A8 и S100A9, участвующие в регуляции воспалительных процессов и иммунного ответа и образующие гетеродимер кальпротектин (S100A8/A9) [122], который при S-нитрозилировании превращается в противовоспалительные агенты, ингибирующие активацию тучных клеток и взаимодействие лейкоцитов с эндотелием [123]. Кроме того, при индукции NOS2 под действием воспалительных стимулов S-нитрозилированный S100A8/A9 *транс*-нитрозилирует контактирующие с ним белки, способствуя переносу нитрозильной группы от NOS2 к отдаленным белкам-мишеням [107]. В настоящее время в клетках и в микроциркуляторном русле идентифицировано более 100 белков, *транс*-нитрозилируемых S100A8/A9 [107], среди которых GAPDH (см. выше), гемоглобин, белки цитоскелета (эзрин, моэзин), связывающие кортикальный актин с плазматической мембраной, и виментин, главный промежуточный филамент в мезенхимальных клетках и метастатических опухолевых клетках [107]. Предполагается, что S-нитрозилирование вызывает конформационные изменения, влияющие на стабильность белка и межбелковые взаимодействия [124].

Уровень S-нитрозилированных белков в клетке определяется клеточным редокс-статусом и активностью денитрозилирования. Высокий статус антиоксидантной системы, повышающий восстановительный потенциал клеток, может предотвратить S-нитрозилирование, тогда как его снижение способствует S-нитрозилированию [125]. Кроме того, уровень S-нитрозилирования в клетках контролируется балансом между S-нитрозилированием

и денитрозилированием. В отличие от S-нитрозилирования, которое обычно является неферментативной реакцией (за исключением прокариот), процесс денитрозилирования может быть как неферментативным, так и ферментативным [12]. Расщепление S-нитрозильной группы может происходить самопроизвольно в присутствии восстановителей (аскорбат, GSH), ионов металлов (Cu^{2+}), в результате действия УФ-излучения, АФК или нуклеофилов [12] и/или катализироваться денитрозилазами, которые ферментативно удаляют нитрозильную группу из S-нитрозотиолов.

Одной из основных денитрозилаз служит S-нитрозоглутатионредуктаза (GSNOR), разлагающая GSNO в ходе необратимой NADH-зависимой реакции в присутствии GSH до продуктов, характер которых определяется соотношением GSH/GSSG. При высоких уровнях GSH образуются GSSG и гидроксиламин, тогда как при низких уровнях GSH/GSSG — глутатионсульфиновая кислота и аммиак. Таким образом, клеточный редокс-потенциал, зависящий от уровней NADH(H^+) и GSH, является важным фактором в контроле образования продуктов S-денитрозилирования [126]. Внутриклеточные уровни S-нитрозилированных белков контролируются GSNOR, которая выводит из игры GSNO, как активнейшего участника реакций *транс*-нитрозилирования, управляя тем самым пулом Pr-SNO в клетке. Сверхэкспрессия или дефекты гена *GSNOR* приводят к нарушению этого баланса и, как следствие, к нарушению NO-зависимого сигналинга, тем самым способствуя возникновению ряда заболеваний, включая злокачественные новообразования.

Установлено, что гипоекспрессия гена *GSNOR* связана с возникновением и прогрессированием гепатоцеллюлярной карциномы и рака молочной железы [127, 128]. Так, экспрессия *GSNOR* снижена примерно в 50% случаев гепатоцеллюлярной карциномы, что связывают с хромосомной делецией *GSNOR* [127]. Гепатоканцерогенез *de novo* после резекции опухоли и плохой прогноз у пациентов с гепатоцеллюлярной карциномой связаны как с дефицитом экспрессии *GSNOR*, так и со сверхэкспрессией гена *NOS2* [129]. Исследования на линии мышей с делецией гена *GSNOR* позволили установить, что дефицит *GSNOR* после внутрибрюшинной инъекции диэтилнитрозамина или липополисахарида приводит к S-нитрозилированию, убиквитинированию и протеасомной деградации ангиотензиногена, активность которого существенна при защите от гепатоцеллюлярной карциномы, индуциро-

ванной диэтилнитрозамином [127]. Для некоторых случаев рака молочной железы также характерно снижение экспрессии *GSNOR*. Так, для опухолей молочной железы с высоким уровнем экспрессии гена *HER2* (human epidermal growth factor receptor 2, *HER2*), что часто наблюдается для агрессивных опухолей с неблагоприятным прогнозом, при фиксации низкого уровня экспрессии *GSNOR* отмечено повышение пула S-нитрозилированных белков, связанных с развитием апоптоза. При этом увеличение экспрессии *GSNOR* в таких опухолях коррелирует с более высоким процентом выживаемости пациентов [128].

На клетках гепатоцеллюлярной карциномы HepG2, карциномы почки 769P, эмбриональной рабдомиосаркомы RD, аденокарциномы молочной железы MCF7 показано, что дефицит *GSNOR* приводит к усилению S-нитрозилирования киназы FAK1 (focal adhesion kinase 1, FAK1) по Cys658, что усиливает аутофосфорилирование FAK1 и поддерживает онкогенность, обеспечивая опухолевым клеткам способность к подвижности и росту [130]. FAK1, известная также как протеинкиназа тирозинкиназы 2 (PTK2), играет важную роль в метастатической трансформации опухолевых клеток. Полученные данные позволяют рассматривать *GSNOR* в качестве онкосупрессора.

Значительный вклад в процессы денитрозилирования вносит тиоредоксин (thioredoxin, Trx). Интерес к Trx объясняется еще тем, что это универсальный фермент, поскольку, помимо дисульфидредуктазной активности, что определяет его как одного из ключевых игроков в клеточном редокс-гомеостазе, он обладает денитрозилазной и *транс*-нитрозилазной активностью [131]. Когда фермент функционирует как дисульфидредуктаза и денитрозилаза, задействованы остатки Cys32 и Cys35 в активном центре, между которыми в процессе катализа образуется дисульфидная связь, восстанавливаемая TrxR в присутствии NADPH(H^+) (рис. 4) [131, 132]. При этом процесс денитрозилирования многостадийный и может протекать по-разному, но в итоге будет происходить высвобождение нитроксила HNO или NO.

В качестве *транс*-нитрозилазы Trx1 функционирует, когда его Cys32 и Cys35 активного центра связаны дисульфидной связью, что может происходить при высоких уровнях АФК и/или низкой активности TrxR. В окисленной форме Trx1 может быть S-нитрозилирован по дополнительному Cys73 вне активного центра и выступать уже в роли *транс*-нитрозилазы в отношении остатков Cys в молекулах-мишенях. Интересно, что стабильность Trx-SNO,

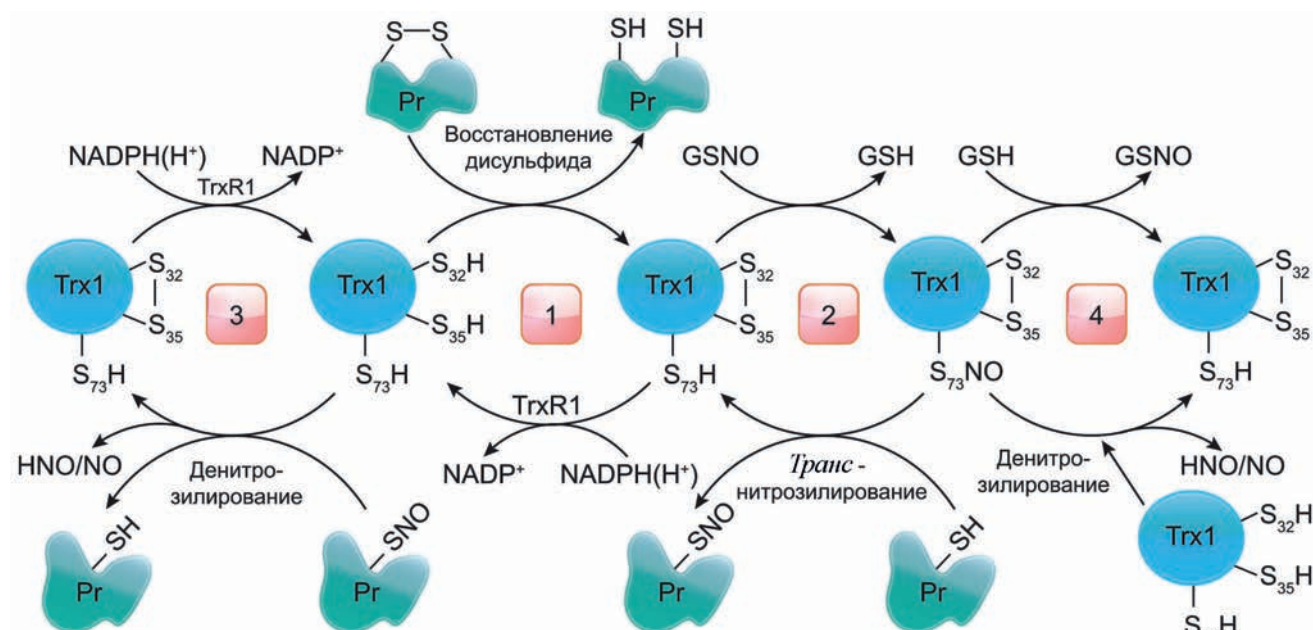


Рис. 4. Механизм *транс*-нитрозилирования и денитрозилирования при участии системы Trx1/TrxR1. 1 – Trx1-(SH)₂, восстанавливая дисульфидные связи в белках-мишенях, окисляется с образованием Trx1-S₂, который восстанавливается с помощью TrxR и NADPH(H⁺). 2 – При повышенном уровне АФК Trx1-S₂ нитрозилируется по Cys73 вне активного центра до SNO-Trx1-S₂, который *транс*-нитрозилирует белки-мишени. 3 – Trx1-(SH)₂ денитрозилирует белки-мишени с образованием HNO или NO. 4 – Денитрозилирование SNO-Trx1-S₂ может происходить в присутствии Trx1-(SH)₂ или GSH

в свою очередь, регулируется восстановителями. Например, восстановленный Trx1-(SH)₂ и GSH будут способствовать денитрозилированию Trx-SNO в клетках, что влияет на баланс между процессами нитрозилирования и денитрозилирования с участием Trx [133, 134].

Гиперэкспрессия гена *TXN1(C32S/C35S)* (мутантного Trx1 с заменой Cys32 и Cys35 серином для имитации Trx1, неактивного в качестве дисульфидредуктазы), как показано на клетках HeLa, способствует нитрозилированию специфических белков-мишеней. С помощью протеомного анализа было идентифицировано 47 новых кандидатов в белки-мишени для *транс*-нитрозилирования Trx1 в этих клетках [133]. Наиболее хорошо охарактеризованной мишенью оказалась эффекторная каспаза-3. Эта модификация приводит к инактивации или активации каспазы-3 в зависимости от редокс-состояния Trx1 [133, 135]. Trx1-(SH)₂ катализирует денитрозилирование нитрозилированной по Cys163 каспазы-3, в то время как Trx1-SNO препятствует апоптозу посредством *транс*-нитрозилирования того же цистеина каспазы-3, тем самым вызывая онкогенную трансформацию [134, 136–138].

In vitro и *in vivo* установлено, что инициаторные каспазы-8 и -9 сигнального каскада, ведущего к апоптозу, также имеют каталитические остатки Cys, которые являются мишенями для S-нитрозилирования [139]. Хотя

пока остается неясным, может ли Trx1 катализировать *транс*-нитрозилирование этих двух инициаторных каспаз. Тем не менее экспериментальные данные свидетельствуют об участии редокс-зависимой системы Trx1/TrxR1 в денитрозилировании SNO-каспазы-9 и восстановительной реактивации каспазы-8 [140, 141]. Несомненно, что регуляция активности каспаз при участии Trx1 играет важную роль в апоптотических сигнальных путях.

Помимо каспаз, в NO-зависимой регуляции механизма апоптоза в опухолевых клетках могут участвовать и другие мишени. Одним из важнейших звеньев, вовлеченных в онкогенез, является изменение в клеточных сигнальных путях, в первую очередь тех, которые отвечают за активацию апоптоза. Цитокины из суперсемейства TNF, такие как FasL, TRAIL и TNFα, могут секретироваться различными клетками в микроокружении опухоли и вызывать либо проопухолевые, либо противоопухолевые эффекты, поскольку реализация запускаемой ими программы зависит от множества факторов, в том числе от различных посттрансляционных модификаций участников передачи сигнала, что в полной мере касается и процессов S-нитрозилирования и денитрозилирования [142, 143]. В частности, рецептор DR4, лигандом которого выступает TRAIL, рассматривается как опухолевый белок-супрессор, функциональная активность которого

связана с запуском внешнего пути активации апоптоза. Донор NO нитрозилкобаламин (аналог витамина B₁₂) обладает высокой антипролиферативной активностью в клетках меланомы, карциномы почки и яичника, вызывая S-нитрозилирование DR4 по остатку Cys336 в цитоплазматическом домене, что способствует его активации. Тогда как точечная мутация C336A в DR4 приводит к потере способности нитрозилкобаламина активировать апоптоз в клетках-мишенях [144].

Рецептор Fas, как установлено на клетках колоректального рака при использовании в качестве донора NO нитроглицерина, может S-нитрозилироваться по двум остаткам Cys199 и Cys304 [145]. Однако только S-нитрозилирование по Cys304 приводит к активации проапоптотической активности, так как такая модификация приводила к включению Fas в липидные рафты, повышению чувствительности клеток к действию FasL и запуску апоптоза [145]. Кроме того, S-нитрозилирование транскрипционного фактора YY1 (Ying Yang 1, YY1), для которого показано репрессирующее действие в отношении рецептора Fas, приводит к инактивации YY1, что повышает экспрессию гена *FAS* и сенсibilизацию опухолевых клеток в отношении агонистов Fas [146].

Изменения в передаче сигнала за счет процессов S-нитрозилирования происходят не только за счет изменения функционирования и активности рецепторов, но и также транскрипционных факторов и киназ, вовлеченных в сигнальные пути, влияющие на жизнеспособность клетки. В частности, S-нитрозилирование/денитрозилирование позволяет регулировать активность STAT3 и NF-κB, которые являются одними из ключевых транскрипционных факторов, участвующих в развитии опухолевой прогрессии, химиорезистентности и метастазировании [147, 148]. Так, STAT3 регулирует экспрессию генов белков, отвечающих за выживание клеток (Bcl-xL, cIAP, сурвивин и Mcl-1), генов белков клеточного цикла (например, c-Мус, CDK2, циклин E, CDK1 и циклин B) и белков, отвечающих за опухолевый ангиогенез (например, VEGF). NF-κB принимает участие в регуляции экспрессии генов белков клеточной выживаемости (cIAP, Bcl-2, Bcl-xL и XIAP), клеточного цикла (c-Мус и циклин D) и мультилекарственной устойчивости (например, MDR1) [114]. На линиях клеток сквамозно-клеточной карциномы головы и шеи HNSCC показано, что активация STAT3 за счет фосфорилирования обратимо подавляется в результате его S-нитрозилирования по остатку Cys259 при действии GSNO [114].

Кроме того, GSNO способствует снижению базальной и цитокин-стимулированной активации NF-κB. Снижение активности STAT3 и NF-κB коррелировало с остановкой клеточного цикла в S- и G2-фазах, снижением пролиферации и активацией апоптоза. При этом наблюдалось снижение экспрессии генов регуляторов клеточного цикла, таких как c-Мус, и антиапоптотических белков Bcl-xL и cIAP (cellular inhibitor of apoptosis protein 1). В модельных экспериментах *in vivo* на мышах с ксенографтами HNSCC системное введение GSNO вызывало снижение опухолевого роста, дополнительное подавление которого наблюдалось при его комбинации с цисплатином и использованием лучевой терапии. Предполагается, что использование GSNO для блокирования NF-κB и STAT3, контролируемых выживание и пролиферацию клеток, дает потенциальную возможность для усиления терапевтического эффекта традиционных методов лечения [114].

S-Нитрозилирование модулирует активность киназ, вовлеченных в клеточный сигналинг. Так, активация ERK1/2-зависимых каскадов, отвечающих за пролиферацию и выживание опухолевых клеток, происходит через фосфорилирование по остаткам Thr202 и Tyr204 киназ ERK1 и ERK2 (extracellular signal-regulated kinases 1 and 2), обладающих 85%-ной гомологией. На клетках глиомы U251 показано [149], что использование GSNO в качестве донора NO вызывает S-нитрозилирование ERK1 по Cys183, находящемуся вблизи остатков Thr202 и Tyr204, приводит к снижению фосфорилирования ERK1/2 и клеточного роста. Замена остатка Cys183 на Ala предотвращает S-нитрозилирование ERK1, восстанавливает фосфорилирование ERK1/2 и подавляет GSNO-индуцированный апоптоз. Повышение фосфорилирования ERK1/2, наряду со снижением S-нитрозилирования ERK1/2, также обнаружено в тканях глиомы человека. С учетом связи между процессами S-нитрозилирования и фосфорилирования ERK1/2 *in vitro* и *in vivo*, предполагается редокс-зависимое участие этих процессов в развитии лекарственной устойчивости глиом [149].

Таким образом, действие АФК/АФА на опухолевые клетки носит двойственный характер. С одной стороны, АФК/АФА могут способствовать инициации злокачественной трансформации за счет активации определенных путей клеточного сигналинга, направленных на усиление пролиферации, выживания и устойчивости к стрессу. Напротив, высокие уровни АФК/АФА могут смягчить прогрессию

опухолеобразования в результате развития окислительного/нитрозативного стресса, вызывающего гибель клеток и ограничение опухолевого роста на определенных фазах развития злокачественных новообразований. Низкие концентрации АФК/АФА, поддерживаемые активностью эндогенной антиоксидантной системы, позволяют осуществлять окислительные/нитрозативные модификации ключевых редокс-зависимых остатков в регуляторных белках. Обратимость таких модификаций, как S-глутатионилирование/S-нитрозилирование, которые происходят посредством электрофильной атаки АФК/АФА на нуклеофильные остатки Cys, обеспечивает редокс-переключения активности сигнальных белков и возможность управления процессами пролиферации и программированной гибели опухолевых клеток. Дальнейшее развитие представлений о системах редокс-зависимого управления кле-

точного гомеостаза, в частности через реакции S-глутатионилирования/S-нитрозилирования, позволят улучшить схемы противоопухолевой терапии с учетом регуляции ключевых ферментов, контролирующих эти процессы и их баланс.

Вклад авторов. Е.В. Калинина — концепция, написание всех разделов, руководство работой; М.Д. Новичкова — написание третьего и четвертого разделов, редактирование текста статьи.

Финансирование. Публикация выполнена при поддержке Программы стратегического академического лидерства РУДН.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sies, H., Belousov, V. V., Chandel, N. S., Davies, M. J., Jones, D. P., Mann, G. E., Murphy, M. P., Yamamoto, M., and Winterbourn, C. (2022) Defining roles of specific reactive oxygen species (ROS) in cell biology and physiology, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **23**, 499-515, doi: 10.1038/s41580-022-00456-z.
2. Ghoneum, A., Abdulfattah, A. Y., Warren, B. O., Shu, J., and Said, N. (2020) Redox homeostasis and metabolism in cancer: a complex mechanism and potential targeted therapeutics, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 3100, doi: 10.3390/ijms21093100.
3. Hayes, J. D., Dinkova-Kostova, A. T., and Tew, K. D. (2020) Oxidative stress in cancer, *Cancer Cell*, **38**, 167-197, doi: 10.1016/j.ccell.2020.06.001.
4. Mishra, D., Patel, V., and Banerjee, D. (2020) Nitric oxide and S-nitrosylation in cancers: emphasis on breast cancer, *Breast Cancer (Auckl)*, **14**, 1178223419882688, doi: 10.1177/1178223419882688.
5. Gorrini, C., Harris, I. S., and Mak, T. W. (2013) Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **12**, 931-947, doi: 10.1038/nrd4002.
6. Moloney, J. N., and Cotter, T. G. (2018) ROS signalling in the biology of cancer, *Semin. Cell Dev. Biol.*, **80**, 50-64, doi: 10.1016/j.semcdb.2017.05.023.
7. Brieger, K., Schiavone, S., Miller, F. J., and Krause, K.-H. (2012) Reactive oxygen species: from health to disease, *Swiss Med. Wkly.*, **142**, w13659, doi: 10.4414/smww.2012.13659.
8. Pan, S., and Chen, R. (2022) Pathological implication of protein post-translational modifications in cancer, *Mol. Aspects Med.*, **86**, 101097, doi: 10.1016/j.mam.2022.101097.
9. Kukulage, D. S. K., Matarage Don, N. N. J., and Ahn, Y. H. (2022) Emerging chemistry and biology in protein glutathionylation, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **71**, 102221, doi: 10.1016/j.cbpa.2022.102221.
10. Zhang, J., Ye, Z. W., Singh, S., Townsend, D. M., and Tew, K. D. (2018) An evolving understanding of the S-glutathionylation cycle in pathways of redox regulation, *Free Radic. Biol. Med.*, **120**, 204-216, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.03.038.
11. Mieyal, J. J., Gallogly, M. M., Qanungo, S., Sabens, E. A., and Shelton, M. D. (2008) Molecular mechanisms and clinical implications of reversible protein S-glutathionylation, *Antioxid. Redox Signal.*, **10**, 1941-1988, doi: 10.1089/ars.2008.2089.
12. Stomberski, C. T., Hess, D. T., and Stamler, J. S. (2019) Protein S-nitrosylation: determinants of specificity and enzymatic regulation of s-nitrosothiol-based signaling, *Antioxid. Redox Signal.*, **30**, 1331-1351, doi: 10.1089/ars.2017.7403.
13. Klaunig, J. E. (2018) Oxidative stress and cancer, *Curr. Pharm. Des.*, **24**, 4771-4778, doi: 10.2174/1381612825666190215121712.
14. Raimondi, V., Ciccarese, F., and Ciminale, V. (2020) Oncogenic pathways and the electron transport chain: a dangerROS liaison, *Br. J. Cancer*, **122**, 168-181, doi: 10.1038/s41416-019-0651-y.
15. Tan, A. S., Baty, J. W., and Berridge, M. V. (2014) The role of mitochondrial electron transport in tumorigenesis and metastasis, *Biochim. Biophys. Acta*, **1840**, 1454-1463, doi: 10.1016/j.bbagen.2013.10.016.
16. Ishikawa, K., Takenaga, K., Akimoto, M., Koshikawa, N., Yamaguchi, A., Imanishi, H.,

- Nakada, K., Honma, Y., and Hayashi, J. (2008) ROS-generating mitochondrial DNA mutations can regulate tumor cell metastasis, *Science*, **320**, 661-664, doi: 10.1126/science.1156906.
17. Hoekstra, A. S., and Bayley, J. P. (2013) The role of complex II in disease, *Biochim. Biophys. Acta*, **1827**, 543-551, doi: 10.1016/j.bbabbio.2012.11.005.
18. Cecchini, G. (2013) Respiratory complex II: role in cellular physiology and disease, *Biochim. Biophys. Acta*, **1827**, 541-542, doi: 10.1016/j.bbabbio.2013.02.010.
19. Liou, G. Y., Doppler, H., DelGiorno, K. E., Zhang, L., Leitges, M., Crawford, H. C., Murphy, M. P., and Storz, P. (2016) Mutant KRas-Induced mitochondrial oxidative stress in acinar cells upregulates EGFR signaling to drive formation of pancreatic precancerous lesions, *Cell Rep.*, **14**, 2325-2336, doi: 10.1016/j.celrep.2016.02.029.
20. Chong, S. J. F., Lai, J. X. H., Eu, J. Q., Bellot, G. L., and Pervaiz, S. (2018) Reactive oxygen species and oncoprotein signaling-A dangerous liaison, *Antioxid. Redox Signal.*, **29**, 1553-1588, doi: 10.1089/ars.2017.7441.
21. Vafa, O., Wade, M., Kern, S., Beeche, M., Pandita, T. K., Hampton, G. M., and Wahl, G. M. (2002) c-Myc can induce DNA damage, increase reactive oxygen species, and mitigate p53 function: a mechanism for oncogene-induced genetic instability, *Mol. Cell*, **9**, 1031-1044, doi: 10.1016/s1097-2765(02)00520-8.
22. Li, F., Wang, Y., Zeller, K. I., Potter, J. J., Wonsey, D. R., O'Donnell, K. A., Kim, J. W., Yustein, J. T., Lee, L. A., and Dang, C. V. (2005) Myc stimulates nuclearly encoded mitochondrial genes and mitochondrial biogenesis, *Mol. Cell. Biol.*, **25**, 6225-6234, doi: 10.1128/MCB.25.14.6225-6234.2005.
23. Vermot, A., Petit-Härtlein, I., Smith, S. M. E., and Fieschi, F. (2021) NADPH oxidases (NOX): an overview from discovery, molecular mechanisms to physiology and pathology, *Antioxidants (Basel)*, **10**, 890, doi: 10.3390/antiox10060890.
24. Konaté, M. M., Antony, S., and Doroshov, J. H. (2020) Inhibiting the activity of NADPH oxidase in cancer, *Antioxid. Redox Signal.*, **33**, 435-454, doi: 10.1089/ars.2020.8046.
25. Kumar, B., Koul, S., Khandrika, L., Meacham, R. B., and Koul, H. K. (2008) Oxidative stress is inherent in prostate cancer cells and is required for aggressive phenotype, *Cancer Res.*, **68**, 1777-1785, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-5259.
26. Mukawera, E., Chartier, S., Williams, V., Pagano, P. J., Lapointe, R., and Grandvaux, N. (2015) Redox-modulating agents target NOX2-dependent IKKepsilon oncogenic kinase expression and proliferation in human breast cancer cell lines, *Redox Biol.*, **6**, 9-18, doi: 10.1016/j.redox.2015.06.010.
27. Dho, S. H., Kim, J. Y., Kwon, E. S., Lim, J. C., Park, S. S., and Kwon, K. S. (2015) NOX5-L can stimulate proliferation and apoptosis depending on its levels and cellular context, determining cancer cell susceptibility to cisplatin, *Oncotarget*, **6**, 39235-39246, doi: 10.18632/oncotarget.5743.
28. Speed, N., and Blair, I. A. (2011) Cyclooxygenase- and lipoxygenase-mediated DNA damage, *Cancer Metastasis Rev.*, **30**, 437-447, doi: 10.1007/s10555-011-9298-8.
29. Krishnamoorthy, S., Jin, R., Cai, Y., Maddipati, K. R., Nie, D., Pagès, G., Tucker, S. C., and Honn, K. V. (2010) 12-Lipoxygenase and the regulation of hypoxia-inducible factor in prostate cancer cells, *Exp. Cell Res.*, **316**, 1706-1715, doi: 10.1016/j.yexcr.2010.03.005.
30. Sarveswaran, S., Chakraborty, D., Chitale, D., Sears, R., and Ghosh, J. (2015) Inhibition of 5-lipoxygenase selectively triggers disruption of c-Myc signaling in prostate cancer cells, *J. Biol. Chem.*, **290**, 4994-5006, doi: 10.1074/jbc.M114.599035.
31. Johnson, B. D., Geldenhuys, W. J., and Hazlehurst, L. A. (2020) The role of ERO1α in modulating cancer progression and immune escape, *J. Cancer Immunol. (Wilmington)*, **2**, 103-115, doi: 10.33696/cancerimmunol.2.023.
32. Arfin, S., Jha, N. K., Jha, S. K., Kesari, K. K., Ruokolainen, J., Roychoudhury, S., Rathi, B., and Kumar, D. (2021) Oxidative stress in cancer cell metabolism, *Antioxidants (Basel)*, **10**, 642, doi: 10.3390/antiox10050642.
33. El Sayed, S. M., Mahmoud, A. A., El Sawy, S. A., Abdelaal, E. A., Fouad, A. M., Yousif, R. S., Hashim, M. S., Hemdan, S. B., Kadry, Z. M., Abdelmoaty, M. A., Gabr, A. G., Omran, F. M., Nabo, M. M., and Ahmed, N. S. (2013) Warburg effect increases steady-state ROS condition in cancer cells through decreasing their antioxidant capacities (anticancer effects of 3-bromopyruvate through antagonizing Warburg effect), *Med. Hypotheses*, **81**, 866-870, doi: 10.1016/j.mehy.2013.08.024.
34. Patra, K. C., and Hay, N. (2014) The pentose phosphate pathway and cancer, *Trends Biochem. Sci.*, **39**, 347-354, doi: 10.1016/j.tibs.2014.06.005.
35. Luo, W., Hu, H., Chang, R., Zhong, J., Knabel, M., O'Meally, R., Cole, R. N., Pandey, A., and Semenza, G. L. (2011) Pyruvate kinase M2 is a PHD3-stimulated coactivator for hypoxia-inducible factor 1, *Cell*, **145**, 732-744, doi: 10.1016/j.cell.2011.03.054.
36. He, C., Danes, J. M., Hart, P. C., Zhu, Y., Huang, Y., de Abreu, A. L., O'Brien, J., Mathison, A. J., Tang, B., Frasor, J. M., Wakefield, L. M., Ganini, D., Stauder, E., Zielonka, J., Gantner, B. N., Urrutia, R. A., Gius, D., and Bonini, M. G. (2019) SOD2 acetylation on lysine 68 promotes stem cell reprogramming in breast cancer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **116**, 23534-23541, doi: 10.1073/pnas.1902308116.
37. Zucker, S. N., Fink, E. E., Bagati, A., Mannava, S., Bianchi-Smiraglia, A., Bogner, P. N., Wawrzyniak, J. A., Foley, C., Leonova, K. I., Grimm, M. J., Moparthy, K., Ionov, Y., Wang, J., Liu, S., Sexton, S.,

- Kandel, E. S., Bakin, A. V., Zhang, Y., Kaminski, N., Segal, B. H., and Nikiforov, M. A. (2014) Nrf2 amplifies oxidative stress via induction of Klf9, *Mol. Cell*, **53**, 916-928, doi: 10.1016/j.molcel.2014.01.033.
38. Hosseini, N., Kourosh-Arami, M., Nadjafi, S., and Ashtari, B. (2022) Structure, distribution, regulation, and function of splice variant isoforms of nitric oxide synthase family in the nervous system, *Curr. Protein Pept. Sci.*, **23**, 510-534, doi: 10.2174/1389203723666220823151326.
 39. Förstermann, U., and Sessa, W. C. (2012) Nitric oxide synthases: regulation and function, *Eur. Heart J.*, **33**, 829-837, doi: 10.1093/eurheartj/ehr304.
 40. Sakamuri, S. S. V. P., Sperling, J. A., Evans, W. R., Dholakia, M. H., Albuck, A. L., Sure, V. N., Satou, R., Mostany, R., and Katakam, P. V. G. (2020) Nitric oxide synthase inhibitors negatively regulate respiration in isolated rodent cardiac and brain mitochondria, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **318**, H295-H300, doi: 10.1152/ajpheart.00720.2019.
 41. Wink, D. A., Hanbauer, I., Grisham, M. B., Laval, F., Nims, R. W., Laval, J., Cook, J., Pacelli, R., Liebmann, J., Krishna, M., Ford, P. C., and Mitchell, J. B. (1996) Chemical biology of nitric oxide: regulation and protective and toxic mechanisms, *Curr. Top. Cell. Regul.*, **34**, 159-187, doi: 10.1016/s0070-2137(96)80006-9.
 42. Thomas, D. D., Ridnour, L. A., Isenberg, J. S., Flores-Santana, W., Switzer, C. H., Donzelli, S., Hussain, P., Vecoli, C., Paolocci, N., Ambs, S., Colton, C. A., Harris, C. C., Roberts, D. D., and Wink, D. A. (2008) The chemical biology of nitric oxide: Implications in cellular signaling, *Free Radic. Biol. Med.*, **45**, 18-31, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2008.03.020.
 43. Wink, D. A., Cook, J. A., Kim, S., Vodovotz, Y., Pacelli, R., Krishna, M. C., Russo, A., Mitchell, J. B., Jourdeuil, D., Miles, A. M., and Grisham, M. B. (1997) Superoxide modulates the oxidation and nitrosation of thiols by nitric oxide derived reactive intermediates, *J. Biol. Chem.*, **272**, 11147-11151, doi: 10.1074/jbc.272.17.11147.
 44. Choudhari, S. K., Chaudhary, M., Bagde, S., Gadgil, A. R., and Joshi, V. (2013) Nitric oxide and cancer: a review, *World J. Surg. Oncol.*, **11**, 118, doi: 10.1186/1477-7819-11-118.
 45. Ambs, S., and Glynn, S. A. (2011) Candidate pathways linking inducible nitric oxide synthase to a basal-like transcription pattern and tumor progression in human breast cancer, *Cell Cycle*, **10**, 619-624, doi: 10.4161/cc.10.4.14864.
 46. Zou, Z., Li, X., Sun, Y., Li, L., Zhang, Q., Zhu, L., Zhong, Z., Wang, M., Wang, Q., Liu, Z., Wang, Y., Ping, Y., Yao, K., Hao, B., and Liu, Q. (2020) NOS1 expression promotes proliferation and invasion and enhances chemoresistance in ovarian cancer, *Oncol. Lett.*, **19**, 2989-2995, doi: 10.3892/ol.2020.11355.
 47. Jones, L. E. Jr, Ying, L., Hofseth, A. B., Jelezcova, E., Sobol, R. W., Ambs, S., Harris, C. C., Espey, M. G., Hofseth, L. J., and Wyatt, M. D. (2009) Differential effects of reactive nitrogen species on DNA base excision repair initiated by the alkyladenine DNA glycosylase, *Carcinogenesis*, **30**, 2123-2129, doi: 10.1093/carcin/bgp256.
 48. Deryagina, V. P., Rizhova, N. I., Savluchinskaya, L. A., and Kirsanov, K. I. (2021) Role of nitric oxide and endothelial NO synthase in carcinogenesis, *Adv. Mol. Oncol.*, **8**, 29-39, doi: 10.17650/2313-805X-2021-8-2-29-39.
 49. Bastian, N. R., Yim, C. Y., Hibbs, J. B., and Samlowski, W. E. (1994) Induction of iron-derived EPR signals in murine cancers by nitric oxide. Evidence for multiple intracellular targets, *J. Biol. Chem.*, **269**, 5127-5131, doi: 10.1016/S0021-9258(17)37664-0.
 50. Vannini, F., Kashfi, K., and Nath, N. (2015) The dual role of iNOS in cancer, *Redox Biol.*, **6**, 334-343, doi: 10.1016/j.redox.2015.08.009.
 51. Wu, X., Wang, Z. F., Xu, Y., Ren, R., Heng, B. L., and Su, Z. X. (2014) Association between three eNOS polymorphisms and cancer risk: a meta-analysis, *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, **15**, 5317-5324, doi: 10.7314/apjcp.2014.15.13.5317.
 52. Kotake, M., Sato, K., Mogi, C., Tobo, M., Aoki, H., Ishizuka, T., Sunaga, N., Imai, H., Kaira, K., Hisada, T., Yamada, M., and Okajima, F. (2014) Acidic pH increases cGMP accumulation through the OGR1/phospholipase C/Ca²⁺/neuronal NOS pathway in N1E-115 neuronal cells, *Cell. Signal.*, **26**, 2326-2332, doi: 10.1016/j.cellsig.2014.07.010.
 53. Penarando, J., Lopez-Sanchez, L. M., Mena, R., Guille-Luna, S., Conde, F., Hernández, V., Toledano, M., Gudiño, V., Raponi, M., Billard, C., Villar, C., Díaz, C., Gómez-Barbadillo, J., De la Haba-Rodríguez, J., Myant, K., Aranda, E., and Rodríguez-Ariza, A. (2018) A role for endothelial nitric oxide synthase in intestinal stem cell proliferation and mesenchymal colorectal cancer, *BMC Biol.*, **16**, 3, doi: 10.1186/s12915-017-0472-5.
 54. Wang, H., Wang, L., Xie, Z., Zhou, S., Li, Y., Zhou, Y., and Sun, M. (2020) Nitric oxide (NO) and NO synthases (NOS)-based targeted therapy for colon cancer, *Cancers (Basel)*, **12**, 1881, doi: 10.3390/cancers12071881.
 55. Thomas, D. D., and Wink, D. A. (2017) NOS2 as an emergent player in progression of cancer, *Antioxid. Redox Signal.*, **26**, 963-965, doi: 10.1089/ars.2016.6835.
 56. Wink, D. A., Ridnour, L. A., Hussain, S. P., and Harris, C. C. (2008) The reemergence of nitric oxide and cancer, *Nitric Oxide*, **19**, 65-67, doi: 10.1016/j.niox.2008.05.003.
 57. Li, C. Q., Pang, B., Kiziltepe, T., Trudel, L. J., Engelward, B. P., Dedon, P. C., and Wogan, G. N. (2006) Threshold effects of nitric oxide-induced toxicity and cellular responses in wild-type and p53-null human lymphoblastoid cells, *Chem. Res. Toxicol.*, **19**, 399-406, doi: 10.1021/tx050283e.

58. Hickok, J. R., and Thomas, D. D. (2010) Nitric oxide and cancer therapy: the emperor has NO clothes, *Curr. Pharm. Des.*, **16**, 381391, doi: 10.2174/138161210790232149.
59. Mintz, J., Vedenko, A., Rosete, O., Shah, K., Goldstein, G., Hare, J. M., Ramasamy, R., and Arora, H. (2021) Current advances of nitric oxide in cancer and anticancer therapeutics, *Vaccines (Basel)*, **9**, 94, doi: 10.3390/vaccines9020094.
60. Hara, M. R., and Snyder, S. H. (2006) Nitric oxide/GAPDH-Siah: a novel cell death cascade, *Cell. Mol. Neurobiol.*, **26**, 527-538, doi: 10.1007/s10571-006-9011-6.
61. Bechtel, T. J., and Weerapana, E. (2017) From structure to redox: the diverse functional roles of disulfides and implications in disease, *Proteomics*, **17**, 10, doi: 10.1002/pmic.201600391.
62. Gilbert, H. F. (1995) Thiol/disulfide exchange equilibria and disulfide bond stability, *Methods Enzymol.*, **251**, 8-28, doi: 10.1016/0076-6879(95)51107-5.
63. Gilbert, H. F. (1990) Molecular and cellular aspects of thiol-disulfide exchange, *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, **63**, 69-172, doi: 10.1002/9780470123096.ch2.
64. Kalinina, E. V., and Gavriluk, L. A. (2020) Glutathione synthesis in cancer cells, *Biochemistry (Moscow)*, **85**, 895-907, doi: 10.1134/S0006297920080052.
65. Szajewski, R. P., and Whitesides, G. M. (1980) Rate constants and equilibrium constants for thiol-disulfide interchange reactions involving oxidized glutathione, *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 2011-2026, doi: 10.1021/ja00526a042.
66. Barinova, K. V., Serebryakova, M. V., Muronetz, V. I., and Schmalhausen, E. V. (2017) S-glutathionylation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase induces formation of C150-C154 intrasubunit disulfide bond in the active site of the enzyme, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.*, **1861**, 3167-3177, doi: 10.1016/j.bbagen.2017.09.008.
67. Arbault, S., Pantano, P., Sojic, N., Amatore, C., Best-Belpomme, M., Sarasin, A., and Vuillaume, M. (1997) Activation of the NADPH oxidase in human fibroblasts by mechanical intrusion of a single cell with an ultramicroelectrode, *Carcinogenesis*, **18**, 569-574, doi: 10.1093/carcin/18.3.569.
68. Deponte, M. (2017) The incomplete glutathione puzzle: just guessing at numbers and figures? *Antioxid. Redox Signal.*, **27**, 1130-1161, doi: 10.1089/ars.2017.7123.
69. Gallogly, M. M., and Mieyal, J. J. (2007) Mechanisms of reversible protein glutathionylation in redox signaling and oxidative stress, *Curr. Opin. Pharmacol.*, **7**, 381-391, doi: 10.1016/j.coph.2007.06.003.
70. Townsend, D. M., Manevich, Y., He, L., Xiong, Y., Bowers, R. R. Jr., Hutchens, S., and Tew, K. D. (2009) Nitrosative stress-induced s-glutathionylation of protein disulfide isomerase leads to activation of the unfolded protein response, *Cancer Res.*, **69**, 7626-7634, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-0493.
71. West, M. B., Hill, B. G., Xuan, Y. T., and Bhatnagar, A. (2006) Protein glutathiolation by nitric oxide: an intracellular mechanism regulating redox protein modification, *FASEB J.*, **20**, 1715-1717, doi: 10.1096/fj.06-5843fje.
72. Salmeen, A., Andersen, J. N., Myers, M. P., Meng, T. C., Hinks, J. A., Tonks, N. K., and Barford, D. (2003) Redox regulation of protein tyrosine phosphatase 1B involves a sulphenyl-amide intermediate, *Nature*, **423**, 769-773, doi: 10.1038/nature01680.
73. Townsend, D. M., Manevich, Y., He, L., Hutchens, S., Pazoles, C. J., and Tew, K. D. (2009) Novel role for glutathione S-transferase pi. Regulator of protein S-Glutathionylation following oxidative and nitrosative stress, *J. Biol. Chem.*, **284**, 436-445, doi: 10.1074/jbc.M805586200.
74. Singh, R. R., and Reindl, K. M. (2021) Glutathione S-transferases in cancer, *Antioxidants (Basel)*, **10**, 701, doi: 10.3390/antiox10050701.
75. Ścisłalska, M., and Milnerowicz, H. (2020) The role of GSTπ isoform in the cells signalling and anticancer therapy, *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.*, **24**, 8537-8550, doi: 10.26355/eurrev_202008_22650.
76. Kim, Y., and Jang, H. H. (2019) The role of peroxiredoxin family in cancer signaling, *J. Cancer Prev.*, **24**, 65-71, doi: 10.15430/JCP.2019.24.2.65.
77. Chae, H. Z., Oubrahim, H., Park, J. W., Rhee, S. G., and Chock, P. B. (2012) Protein glutathionylation in the regulation of peroxiredoxins: a family of thiol-specific peroxidases that function as antioxidants, molecular chaperones, and signal modulators, *Antioxid. Redox Signal.*, **16**, 506-523, doi: 10.1089/ars.2011.4260.
78. Manevich, Y., and Fisher, A. B. (2005) Peroxiredoxin 6, a 1-Cys peroxiredoxin, functions in antioxidant defense and lung phospho-lipid metabolism, *Free Radic. Biol. Med.*, **38**, 1422-1432, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2005.02.011.
79. Manevich, Y., Hutchens, S., Tew, K., and Townsend, D. (2013) Allelic variants of glutathione S-transferase P1-1 differentially mediate the peroxidase function of peroxiredoxin VI and alter membrane lipid peroxidation, *Free Radic. Biol. Med.*, **54**, 62-70, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.10.556.
80. Levine, A. J. (1997) p53, the cellular gatekeeper for growth and division, *Cell*, **88**, 323-331, doi: 10.1016/s0092-8674(00)81871-1.
81. Yusuf, M. A., Chuang, T., Bhat, G. J., and Srivenugopal, K. S. (2010) Cys-141 glutathionylation of human p53: Studies using specific polyclonal antibodies in cancer samples and cell lines, *Free Radic. Biol. Med.*, **49**, 908-917, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.06.020.
82. Sporn, M. B., and Liby, K. T. (2012) NRF2 and cancer: the good, the bad and the importance of context, *Nat. Rev. Cancer*, **12**, 564-571, doi: 10.1038/nrc3278.

83. Chang, L. C., Fan, C. W., Tseng, W. K., and Hua, C. C. (2021) The level of S-glutathionylated protein is a predictor for metastasis in colorectal cancer and correlated with those of Nrf2/Keap1 pathway, *Biomarkers*, **26**, 780-787, doi: 10.1080/1354750X.2021.1999503.
84. Bonay, M., Roux, A. L., Floquet, J., Retory, Y., Herrmann, J. L., Lofaso, F., and Deramaudt, T. B. (2015) Caspase-independent apoptosis in infected macrophages triggered by sulforaphane via Nrf2/p38 signaling pathways, *Cell Death Discov.*, **1**, 15022, doi: 10.1038/cddiscovery.2015.22.
85. Zhao, X., Dong, W., Gao, Y., Shin, D. S., Ye, Q., Su, L., Jiang, F., Zhao, B., and Miao, J. (2017) Novel indolyl-chalcone derivatives inhibit A549 lung cancer cell growth through activating Nrf-2/HO-1 and inducing apoptosis *in vitro* and *in vivo*, *Sci. Rep.*, **7**, 3919, doi: 10.1038/s41598-017-04411-3.
86. Wang, L., Qu, G., Gao, Y., Su, L., Ye, Q., Jiang, F., Zhao, B., and Miao, J. (2018) A small molecule targeting glutathione activates Nrf2 and inhibits cancer cell growth through promoting Keap-1 S-glutathionylation and inducing apoptosis, *RSC Adv.*, **8**, 792-804, doi: 10.1039/c7ra11935f.
87. Kawano, T., Inokuchi, J., Eto, M., Murata, M., and Kang, J. H. (2022) Protein kinase C (PKC) isozymes as diagnostic and prognostic biomarkers and therapeutic targets for cancer, *Cancers (Basel)*, **14**, 5425, doi: 10.3390/cancers14215425.
88. Benavides, F., Blando, J., Perez, C. J., Garg, R., Conti, C. J., DiGiovanni, J., and Kazanietz, M. G. (2011) Transgenic overexpression of PKC-epsilon in the mouse prostate induces preneoplastic lesions, *Cell Cycle*, **10**, 268-277, doi: 10.4161/cc.10.2.14469.
89. Wang, H., Gutierrez-Uzquiza, A., Garg, R., Barrio-Real, L., Abera, M. B., Lopez-Haber, C., Rosemblyt, C., Lu, H., Abba, M., and Kazanietz, M. G. (2014) Transcriptional regulation of oncogenic protein kinase C (PKC) by STAT1 and Sp1 proteins, *J. Biol. Chem.*, **289**, 19823-19838, doi: 10.1074/jbc.M114.548446.
90. Ward, N. E., Stewart, J. R., Ioannides, A. C. G., and O'Brian, C. A. (2000) Oxidant-induced S-glutathiolation inactivates protein kinase C- α (PKC- α): a potential mechanism of PKC isozyme regulation, *Biochemistry*, **39**, 10319-10329, doi: 10.1021/bi000781g.
91. Manuel, A., Qian, X., van de Wetering, C., Chia, S. B., Aboushousha, R., van der Velden, J., Dixon, A. E., Poynter, M., Lam, Y.-W., Irvin, C. G., and Janssen-Heininger, Y. M. W. (2019) S-glutathionylation of pyruvate kinase M2 is associated with metabolic reprogramming and cytokine production in the development of allergic obese airway disease, in *A21, Advances in Asthma Pathogenesis*, A1048, doi: 10.1164/ajrcm-conference.2019.199.1_MeetingAbstracts.A1048.
92. Seo, M., and Lee Y. H. (2014) PFKFB3 regulates oxidative stress homeostasis via its S-glutathionylation in cancer, *J. Mol. Biol.*, **426**, 830-842, doi: 10.1016/j.jmb.2013.11.021.
93. Adachi, T., Pimentel, D. R., Heibeck, T., Hou, X., Lee, Y. J., Jiang, B., Ido, Y., and Cohen, R. A. (2004) S-glutathiolation of Ras mediates redox-sensitive signaling by angiotensin II in vascular smooth muscle cells, *J. Biol. Chem.*, **279**, 29857-29862, doi: 10.1074/jbc.M313320200.
94. Boudreau, M. W., Peh, J., Hergenrother, P. J. (2019) Procaspase-3 overexpression in cancer: a paradoxical observation with therapeutic potential, *ACS Chem. Biol.*, **14**, 2335-2348, doi: 10.1021/acscchembio.9b00338.
95. Beer, S. M., Taylor, E. R., Brown, S. E., Dahm, C. C., Costa, N. J., Runswick, M. J., and Murphy, M. P. (2004) Glutaredoxin 2 catalyzes the reversible oxidation and glutathionylation of mitochondrial membrane thiol proteins: Implications for mitochondrial redox regulation and antioxidant defence, *J. Biol. Chem.*, **279**, 47939-47951, doi: 10.1074/jbc.M408011200.
96. Ukuwela, A. A., Bush, A. I., Wedd, A. G., and Xiao, Z. (2017) Reduction potentials of protein disulfides and catalysis of glutathionylation and deglutathionylation by glutaredoxin enzymes, *Biochem. J.*, **474**, 3799-3815, doi: 10.1042/BCJ20170589.
97. Pal, D., Rai, A., Checker, R., Patwardhan, R. S., Singh, B., Sharma, D., and Sandur, S. K. (2021) Role of protein S-Glutathionylation in cancer progression and development of resistance to anti-cancer drugs, *Arch. Biochem. Biophys.*, **704**, 108890, doi: 10.1016/j.abb.2021.108890.
98. Findlay, V. J., Townsend, D. M., Morris, T. E., Fraser, J. P., He, L., and Tew, K. D. (2006) A novel role for human sulfiredoxin in the reversal of glutathionylation, *Cancer Res.*, **66**, 6800-6806, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-0484.
99. Park, J. W., Mieyal, J. J., Rhee, S. G., and Chock, P. B. (2009) Deglutathionylation of 2-Cys peroxiredoxin is specifically catalyzed by sulfiredoxin, *J. Biol. Chem.*, **284**, 23364-23374, doi: 10.1074/jbc.M109.021394.
100. Menon, D., and Board, P. G. (2013) A role for glutathione transferase Omega 1 (GSTO1-1) in the glutathionylation cycle, *J. Biol. Chem.*, **288**, 25769-25779, doi: 10.1074/jbc.M113.487785.
101. Hughes, M. M., Hooftman, A., Angiari, S., Tum-mala, P., Zaslona, Z., Runtsch, M. C., McGettrick, A. F., Sutton, C. E., Diskin, C., Rooke, M., Takahashi, S., Sundararaj, S., Casarotto, M. G., Dahlstrom, J. E., Palsson-McDermott, E. M., Corr, S. C., Mills, K. H. G., Preston, R. J. S., Neamati, N., Xie, Y., Baell, J. B., Board, P. G., and O'Neill, L. A. J. (2019) Glutathione transferase omega-1 regulates NLRP3 inflammasome activation through NEK7 deglutathionylation, *Cell Rep.*, **29**, 151-161.e5, doi: 10.1016/j.celrep.2019.08.072.
102. Ruoppolo, M., and Freedman, R. B. (1995) Refolding by disulfide isomerization: the mixed disulfide between ribonuclease T1 and glutathione as a model refolding

- substrate, *Biochemistry*, **34**, 9380-9388, doi: 10.1021/bi00029a014.
103. Yang, S., Jackson, C., Karapetyan, E., Dutta, P., Kermah, D., Wu, Y., Wu, Y., Schloss, J., and Vadgama, J. V. (2022) Roles of protein disulfide isomerase in breast cancer, *Cancers (Basel)*, **14**, 745, doi: 10.3390/cancers14030745.
 104. Martínez-Ruiz, A., Araújo, I. M., Izquierdo-Álvarez, A., Hernansanz-Agustín, P., Lamas, S., and Serrador, J. (2013) Specificity in S-nitrosylation: a short-range mechanism for NO signaling? *Antioxid. Redox Signal.*, **19**, 1220-1235, doi: 10.1089/ars.2012.5066.
 105. Nakamura, T., and Lipton, S. A. (2016) Protein S-nitrosylation as a therapeutic target for neurodegenerative diseases, *Trends Pharmacol. Sci.*, **37**, 73-84, doi: 10.1016/j.tips.2015.10.002.
 106. Ravi, K., Brennan, L. A., Levic, S., Ross, P. A., and Black, S. M. (2004) S-nitrosylation of endothelial nitric oxide synthase is associated with monomerization and decreased enzyme activity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 2619-2624, doi: 10.1073/pnas.0300464101.
 107. Jia, J., Arif, A., Terenzi, F., Willard, B., Plow, E. F., Hazen, S. L., and Fox, P. L. (2014) Target-selective protein S-nitrosylation by sequence motif recognition, *Cell*, **159**, 623-634, doi: 10.1016/j.cell.2014.09.032.
 108. Möller, M. N., Li, Q., Vitturi, D. A., Robinson, J. M., Lancaster, J. R. J., and Denicola, A. (2007) Membrane "lens" effect: focusing the formation of reactive nitrogen oxides from the *NO/O₂ reaction, *Chem. Res. Toxicol.*, **20**, 709-714, doi: 10.1021/tx700010h.
 109. Bartberger, M. D., Liu, W., Ford, E., Miranda, K. M., Switzer, C., Fukuto, J. M., Farmer, P. J., Wink, D. A., and Houk, K. N. (2002) The reduction potential of nitric oxide (NO) and its importance to NO biochemistry, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 10958-10963, doi: 10.1073/pnas.162095599.
 110. Nakamura, T., and Lipton, S. A. (2013) Emerging role of protein-protein transnitrosylation in cell signaling pathways, *Antioxid. Redox Signal.*, **18**, 239-249, doi: 10.1089/ars.2012.4703.
 111. Broniowska, K. A., Diers, A. R., and Hogg, N. (2013) S-nitrosoglutathione, *Biochim. Biophys. Acta*, **1830**, 3173-3181, doi: 10.1016/j.bbagen.2013.02.004.
 112. Giri, S., Rattan, R., Deshpande, M., Maguire, J. L., Johnson, Z., Graham, R. P., and Shridhar, V. (2014) Preclinical therapeutic potential of a nitrosylating agent in the treatment of ovarian cancer, *PLoS One*, **9**, e97897, doi: 10.1371/journal.pone.0097897.
 113. Marozkina, N. V., and Gaston, B. (2012) S-Nitrosylation signaling regulates cellular protein interactions, *Biochim. Biophys. Acta*, **1820**, 722-729, doi: 10.1016/j.bbagen.2011.06.017.
 114. Kaliyaperumal, K., Sharma, A. K., McDonald, D. G., Dhindsa, J. S., Yount, C., Singh, A. K., Won, J. S., and Singh, I. (2015) S-Nitrosoglutathione-mediated STAT3 regulation in efficacy of radiotherapy and cisplatin therapy in head and neck squamous cell carcinoma, *Redox Biol.*, **6**, 41-50, doi: 10.1016/j.redox.2015.07.001.
 115. Zhang, Y., Sun, C., Xiao, G., Shan, H., Tang, L., Yi, Y., Yu, W., and Gu, Y. (2019) S-nitrosylation of the Peroxiredoxin-2 promotes S-nitrosoglutathione-mediated lung cancer cells apoptosis via AMPK-SIRT1 pathway, *Cell Death Dis.*, **10**, 329, doi: 10.1038/s41419-019-1561-x.
 116. Vanin, A. F., Ostrovskaya, L. A., Korman, D. B., Rykova, V. A., Bluchterova, N. V., and Fomina, M. M. (2020) The antitumor properties of dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands and S-nitrosoglutathione in experiments, *Biophysics*, **65**, 39-50, doi: 10.1134/s0006350920010236.
 117. Hara, M. R., Agrawal, N., Kim, S. F., Cascio, M. B., Fujimuro, M., Ozeki, Y., Takahashi, M., Cheah, J. H., Tankou, S. K., Hester, L. D., Ferris, C. D., Hayward, S. D., Snyder, S. H., and Sawa, A. (2005) S-nitrosylated GAPDH initiates apoptotic cell death by nuclear translocation following Siah1 binding, *Nat. Cell Biol.*, **7**, 665-674, doi: 10.1038/ncb1268.
 118. Kornberg, M. D., Sen, N., Hara, M. R., Juluri, K. R., Nguyen, J. V., Snowman, A. M., Law, L., Hester, L. D., and Snyder, S. H. (2010) GAPDH mediates nitrosylation of nuclear proteins, *Nat. Cell Biol.*, **12**, 1094-1100, doi: 10.1038/ncb2114.
 119. Kohr, M. J., Murphy, E., and Steenbergen, C. (2014) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase acts as a mitochondrial trans-S-nitrosylase in the heart, *PLoS One*, **9**, e111448, doi: 10.1371/journal.pone.0111448.
 120. Nakajima, H., Itakura, M., Kubo, T., Kaneshige, A., Harada, N., Izawa, T., Azuma, Y. T., Kuwamura, M., Yamaji, R., and Takeuchi, T. (2017) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) aggregation causes mitochondrial dysfunction during oxidative stress-induced cell death, *J. Biol. Chem.*, **292**, 4727-4742, doi: 10.1074/jbc.M116.759084.
 121. Wen, Y. Y., Yang, Z. Q., Song, M., Li, B. L., Yao, X. H., Chen, X. L., Zhao, J., Lu, Y. Y., Zhu, J. J., and Wang, E. H. (2010) The expression of SIAH1 is down-regulated and associated with Bim and apoptosis in human breast cancer tissues and cells, *Mol. Carcinog.*, **49**, 440-449, doi: 10.1002/mc.20615.
 122. Hsu, K., Champaiboon, C., Guenther, B. D., Sorenson, B. S., Khammanivong, A., Ross, K. F., Geczy, C. L., and Herzberg, M. C. (2009) Anti-infective protective properties of s100 calgranulins, *Antiinflamm. Antiallergy Agents Med. Chem.*, **8**, 290-305, doi: 10.2174/187152309789838975.
 123. Lim, S. Y., Raftery, M., Cai, H., Hsu, K., Yan, W. X., Hsieh, H. L., Watts, R. N., Richardson, D., Thomas, S., Perry, M., and Geczy, C. L. (2008) S-nitrosylated S100A8: novel anti-inflammatory properties, *J. Immunol.*, **181**, 5627-5636, doi: 10.4049/jimmunol.181.8.5627.
 124. Baritaki, S., Huerta-Yepe, S., Sahakyan, A., Karagiannides, I., Bakirtzi, K., Jazirehi, A., and

- Bonavida, B. (2010) Mechanisms of nitric oxide-mediated inhibition of EMT in cancer: inhibition of the metastasis-inducer Snail and induction of the metastasis-suppressor RKIP, *Cell Cycle*, **9**, 4931-4940, doi: 10.4161/cc.9.24.14229.
125. Fernando, V., Zheng, X., Walia, Y., Sharma, V., Letson, J., and Furuta, S. (2019) S-nitrosylation: an emerging paradigm of redox signaling, *Antioxidants (Basel)*, **8**, 404, doi: 10.3390/antiox8090404.
126. Staab, C. A., Alander, J., Brandt, M., Lengqvist, J., Morgenstern, R., Grafström, R. C., and Höög, J. O. (2008) Reduction of S-nitrosoglutathione by alcohol dehydrogenase 3 is facilitated by substrate alcohols via direct cofactor recycling and leads to GSH-controlled formation of glutathione transferase inhibitors, *Biochem. J.*, **413**, 493-504, doi: 10.1042/BJ20071666.
127. Wei, W., Li, B., Hanes, M. A., Kakar, S., Chen, X., and Liu, L. (2010) Snitrosylation from GSNOR deficiency impairs DNA repair and promotes hepatocarcinogenesis, *Sci. Transl. Med.*, **2**, 19ra13, doi: 10.1126/scitranslmed.3000328.
128. Canas, A., Lopez-Sanchez, L. M., Penarando, J., Valverde, A., Conde, F., Hernández, V., Fuentes, E., López-Pedraza, C., de la Haba-Rodríguez, J. R., Aranda, E., and Rodríguez-Ariza, A. (2016) Altered S-nitrosothiol homeostasis provides a survival advantage to breast cancer cells in HER2 tumors and reduces their sensitivity to trastuzumab, *Biochim. Biophys. Acta*, **1862**, 601-610, doi: 10.1016/j.bbadis.2016.02.005.
129. Hoshida, Y., Villanueva, A., Kobayashi, M., Peix, J., Chiang, D. Y., Hernández, V., Fuentes, E., López-Pedraza, C., de la Haba-Rodríguez, J. R., Aranda, E., and Rodríguez-Ariza, A. (2008) Gene expression in fixed tissues and outcome in hepatocellular carcinoma, *N. Engl. J. Med.*, **359**, 1995-2004, doi: 10.1056/NEJMoa0804525.
130. Rizza, S., Di Leo, L., Pecorari, C., Giglio, P., Faienza, F., Montagna, C., Maiani, E., Puglia, M., Bosisio, F. M., Petersen, T. S., Lin, L., Rissler, V., Vilorio, J. S., Luo, Y., Papaleo, E., De Zio, D., Blagoev, B., and Filomeni, G. (2023) GSNOR deficiency promotes tumor growth via FAK1 S-nitrosylation, *Cell Rep.*, **42**, 111997, doi: 10.1016/j.celrep.2023.111997.
131. Benhar, M. (2015) Nitric oxide and the thioredoxin system: a complex interplay in redox regulation, *Biochim. Biophys. Acta*, **1850**, 2476-2484, doi: 10.1016/j.bbagen.2015.09.010.
132. Benhar, M., Forrester, M. T., Hess, D. T., and Stamler, J. S. (2008) Regulated protein denitrosylation by cytosolic and mitochondrial thioredoxins, *Science*, **320**, 1050-1054, doi: 10.1126/science.1158265.
133. Wu, C., Liu, T., Chen, W., Oka, S., Fu, C., Jain, M. R., Parrott, A. M., Baykal, A. T., Sadoshima, J., and Li, H. (2010) Redox regulatory mechanism of transnitrosylation by thioredoxin, *Mol. Cell. Proteomics*, **9**, 2262-2275, doi: 10.1074/mcp.M110.000034.
134. Sengupta, R., Ryter, S. W., Zuckerbraun, B. S., Tzeng, E., Billiar, T. R., and Stoyanovsky, D. A. (2007) Thioredoxin catalyzes the denitrosation of low-molecular mass and protein S-nitrosothiols, *Biochemistry*, **46**, 8472-8483, doi: 10.1021/bi700449x.
135. Mitchell, D. A., Morton, S. U., Fernhoff, N. B., and Marletta, M. A. (2007) Thioredoxin is required for S-nitrosation of procaspase-3 and the inhibition of apoptosis in Jurkat cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 11609-11614, doi: 10.1073/pnas.0704898104.
136. Stoyanovsky, D. A., Scott, M. J., and Billiar, T. R. (2013) Glutathione and thioredoxin type 1 cooperatively denitrosate HepG2 cells-derived cytosolic S-nitrosoproteins, *Org. Biomol. Chem.*, **11**, 4433-4437, doi: 10.1039/c3ob40809d.
137. Ren, X., Sengupta, R., Lu, J., Lundberg, J. O., and Holmgren, A. (2019) Characterization of mammalian glutaredoxin isoforms as S-denitrosylases, *FEBS Lett.*, **593**, 1799-1806, doi: 10.1002/1873-3468.13454.
138. Sengupta, R., and Holmgren, A. (2012) The role of thioredoxin in the regulation of cellular processes by S-nitrosylation, *Biochim. Biophys. Acta*, **1820**, 689-700, doi: 10.1016/j.bbagen.2011.08.012.
139. Mnatsakanyan, R., Markoutsas, S., Walbrunn, K., Roos, A., Verhelst, S. H. L., and Zahedi, R. P. (2019) Proteome-wide detection of S-nitrosylation targets and motifs using bioorthogonal cleavable-linker-based enrichment and switch technique, *Nat. Commun.*, **10**, 2195, doi: 10.1038/s41467-019-10182-4.
140. Okamoto, S., Nakamura, T., Cieplak, P., Chan, S. F., Kalashnikova, E., Liao, L., Saleem, S., Han, X., Clemente, A., Nutter, A., Sances, S., Brechtel, C., Haus, D., Haun, F., Sanz-Blasco, S., Huang, X., Li, H., Zaremba, J. D., Cui, J., Gu, Z., Nikzad, R., Harrop, A., McKercher, S. R., Godzik, A., Yates, J. R. 3rd, and Lipton, S. A. (2014) S-nitrosylation-mediated redox transcriptional switch modulates neurogenesis and neuronal cell death, *Cell Rep.*, **8**, 217-228, doi: 10.1016/j.celrep.2014.06.005.
141. Veron, D., Aggarwal, P. K., Velazquez, H., Kashgarian, M., Moeckel, G., and Tufro, A. (2014) Podocyte-specific VEGF-a gain of function induces nodular glomerulosclerosis in eNOS null mice, *J. Am. Soc. Nephrol.*, **25**, 1814-1824, doi: 10.1681/ASN.2013070752.
142. Sharma, V., Fernando, V., Letson, J., Walia, Y., Zheng, X., Fackelman, D., and Furuta, S. (2021) S-nitrosylation in tumor microenvironment, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 4600, doi: 10.3390/ijms22094600.
143. Plenchette, S., Romagny, S., Laurens, V., and Bettaieb, A. (2015) S-Nitrosylation in TNF superfamily signaling pathway: implication in cancer, *Redox Biol.*, **6**, 507-515, doi: 10.1016/j.redox.2015.08.019.
144. Tang, Z., Bauer, J. A., Morrison, B., and Lindner, D. J. (2006) Nitrosylcobalamin promotes cell death via S nitrosylation of Apo2L/TRAIL receptor DR4, *Mol. Cell. Biol.*, **26**, 5588-5594, doi: 10.1128/MCB.00199-06.

145. Leon-Bollotte, L., Subramaniam, S., Cauvard, O., Plenchette-Colas, S., Paul, C., Godard, C., Martinez-Ruiz, A., Legembre, P., Jeannin, J. F., and Bettaieb, A. (2011) S-nitrosylation of the death receptor fas promotes fas ligand-mediated apoptosis in cancer cells, *Gastroenterology*, **140**, 2009-2018, doi: 10.1053/j.gastro.2011.02.053.
146. Hongo, F., Garban, H., Huerta-Yepez, S., Vega, M., Jazirehi, A. R., Mizutani, Y., Miki, T., and Bonavida, B. (2005) Inhibition of the transcription factor Yin Yang 1 activity by S-nitrosation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **336**, 692-701, doi: 10.1016/j.bbrc.2005.08.150.
147. Wilczynski, J., Duechler, M., and Czyz, M. (2011) Targeting NF- κ B and HIF-1 pathways for the treatment of cancer: part I, *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*, **59**, 289-299, doi: 10.1007/s00005-011-0131-4.
148. Egloff, A. M., and Grandis, J. R. (2011) Response to combined molecular targeting: defining the role of P-STAT3, *Clin. Cancer Res.*, **17**, 393-395, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-2925.
149. Jin, L., Cao, Y., Zhang, T., Wang, P., Ji, D., Liu, X., Shi, H., Hua, L., Yu, R., and Gao, S. (2018) Effects of ERK1/2 S-nitrosylation on ERK1/2 phosphorylation and cell survival in glioma cells, *Int. J. Mol. Med.*, **41**, 1339-1348, doi: 10.3892/ijmm.2017.3334.

S-GLUTATHIONYLATION AND S-NITROSYLATION AS MODULATORS OF REDOX-DEPENDENT PROCESSES IN CANCER CELL

Review

E. V. Kalinina* and M. D. Novichkova

*Peoples's Friendship University of Russia (RUDN University),
117198 Moscow, Russia; e-mail: kalinina-ev@rudn.ru*

The development of oxidative/nitrosative stress associated with the activation of oncogenic pathways is a consequence of an increase in the level of generation of reactive oxygen and nitrogen species (ROS/RNS) in tumor cells. The action of ROS/RNS is dual: high levels cause cell death and limit tumor growth at certain phases of malignant neoplasm development, while low concentrations allow oxidative/nitrosative modifications of key redox-dependent residues in regulatory proteins. The reversibility of such modifications as S-glutathionylation/S-nitrosylation, which occur through the electrophilic attack of ROS/RNS on the nucleophilic residues of Cys, provides redox switching in the activity of signaling proteins and the ability to control the processes of proliferation and programmed death. The level of S-glutathionylated and S-nitrosylated proteins is controlled by the balance between S-glutathionylation/deglutathionylation and S-nitrosylation/denitrosylation, the ratio of which depends on the cellular redox status. The degree of S-glutathionylation and S-nitrosylation of protein targets and their ratio largely determines the state and directions of signaling pathways in cancer cells. The review discusses the features of S-glutathionylation and S-nitrosylation reactions in cancer cells, the balance of systems that control their activity and their relationship with redox-dependent processes and tumor growth.

Keywords: reactive oxygen and nitrogen species, oxidative and nitrosative stress, cancer cells, S-glutathionylation and deglutathionylation, S-nitrosylation, *trans*-nitrosylation, denitrosylation

МЕТИОНИНОВАЯ ЗАВИСИМОСТЬ РАКОВЫХ КЛЕТОК – МИШЕНЬ МЕТИОНИНАЗЫ

Обзор

© 2023 В.С. Покровский^{1,2,3*}, Л. Або Кура^{1,2}, Е.А. Демидова¹, Ц. Хань⁴, Р.М. Хоффман^{4,5}

¹ Национальный медицинский исследовательский онкологический центр им. Н.Н. Блохина
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
115478 Москва, Россия; электронная почта: v.pokrovsky@ronc.ru

² Научно-исследовательский институт молекулярной и клеточной медицины
Российского университета дружбы народов (РУДН),
117198 Москва, Россия; электронная почта: louay.ko@gmail.com

³ Научно-технологический университет «Сириус», отдел биотехнологии, 354340 Сочи, Россия

⁴ AntiCancer Inc., 92111 Сан-Диего, Калифорния, США; электронная почта: all@anticancer.com

⁵ Калифорнийский университет, отделение хирургии,
92037-7400 Сан-Диего, Ла-Хойя, Калифорния, США

Поступила в редакцию 11.02.2023

После доработки 12.03.2023

Принята к публикации 13.03.2023

Все типы раковых клеток отличаются метиониновой зависимостью, известной как эффект Хоффмана. Ограничение поступления метионина (L-Met) подавляет рост и пролиферацию раковых клеток, между тем как нормальные клетки от дефицита L-Met не страдают. Метиониновая зависимость является мишенью метиониназы (METase), которая показала свою эффективность и безопасность на всех изученных типах опухолевых моделей *in vitro* и *in vivo*, как в монотерапии, так и в комбинации с другими противоопухолевыми препаратами. Примерно 6 лет назад была получена METase, которая может применяться перорально как добавка к пище, улучшая результаты лечения некоторых пациентов с распространёнными опухолями. К настоящему моменту METase была изучена в 8 клинических исследованиях, включая 2 в 1990-х гг. и 6 – в более позднее время. Этот обзор посвящён клиническим исследованиям ограничения поступления L-Met в опухолевые клетки при помощи METase, в частности, при помощи пероральной лекарственной формы METase или в комбинации с другими препаратами в лечении пациентов с прогрессирующим раком.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: метиониновая зависимость, метионин-γ-лиаза, пероральная METase, эффект Хоффмана, клиническое исследование, ограничение метионина, разрушающий метионин фермент.

DOI: 10.31857/S0320972523070072, **EDN:** FXHDNJ

ВВЕДЕНИЕ

Более чем 60 лет исследований метаболизма раковых клеток показали, что отсутствие определённых аминокислот подавляет рост и пролиферацию раковых клеток гораздо более выражено, чем для нормальных клеток [1]. Sugimura et al. впервые показали, что удаление аминокислоты метионина (L-Met) из диеты крыс с опухолями уменьшает рост опухоли более выражено, чем удаление других

аминокислот [1]. 50 лет назад была обнаружена зависимость опухолевых клеток от L-Met [2], которая получила название «эффекта Хоффмана» [3]. Зависимость от L-Met обусловлена повышенной потребностью в этой аминокислоте опухолевых клеток, которые расходуют её на реакции трансметилирования [2, 4–8].

Ограничение поступления L-Met может быть эффективной стратегией в лечении опухолей, зависимых от L-Met для роста и выживания, между тем как на нормальные клетки

Принятые сокращения: CEA – карциноэмбриональный антиген; L-Нсу – L-гомоцистеин; L-Met – метионин; METase – метиониназа; o-гMETase – пероральная гMETase; PSA – простат-специфичный антиген; гMETase – рекомбинантная METase; SAM – аденозилметионин.

* Адресат для корреспонденции.

ограничение L-Met в присутствии L-гомоцистеина (L-Нсу) выраженного цитотоксического действия не оказывает [2, 4, 9, 10]. В нескольких исследованиях *in vivo* использовалась ограничивающая L-Met диета и сообщалось об ингибировании роста опухоли и возрастающей продолжительности жизни животных [11, 12].

Вегетарианская диета, которая может уменьшить поступление L-Met, может быть эффективной стратегией, предотвращающей рост опухолей у человека [11, 12], но при этом снижение уровня L-Met в организме может быть недостаточным. Другой эффективной стратегией, препятствующей опухолевому росту, может быть использование метиониназы (METase), которая уменьшает концентрацию L-Met в кровотоке [13]. Ограничение поступления L-Met с пищей в сочетании с химиотерапией было впервые использовано почти 40 лет назад [14]. Современные исследования делают акцент на применении METase в сочетании с другими химиотерапевтическими агентами [15–20].

Настоящий обзор посвящён эффективности METase, в частности, её пероральной лекарственной формы, в качестве самостоятельного средства или в комбинации с химиотерапевтическими агентами при лечении пациентов с поздней стадией злокачественных новообразований, включая гормон-независимый рак простаты, рак яичников, рак поджелудочной железы, рак прямой кишки и инвазивный дольковый рак молочной железы.

МЕТАБОЛИЗМ L-Met

L-Met — серосодержащая аминокислота, необходимая для жизнедеятельности и роста клеток. Метаболизм L-Met можно разделить на три различных пути: (1) цикл L-Met, который продуцирует аденозилметионин (SAM) [21]; (2) путь восстановления L-Met, который перерабатывает L-Met из побочных продуктов (S-метил-5'-тиоаденозина) пути синтеза полиаминов [3]; и (3) путь транссульфурации, который продуцирует антиоксидант глутатион (рисунки) [3]. Кроме того, поскольку метаболизм фолатов и цикл L-Met тесно связаны, они оба могут косвенно влиять на биосинтез нуклеотидов. Фолаты необходимы для синтеза L-Met (рисунки), и неудивительно, что раковые заболевания зависимы от фолиевой кислоты [10].

На первом этапе метаболизма L-Met метионинаденозилтрансфераза (MAT; EC 2.5.1.6) в присутствии АТФ катализирует образование SAM из L-Met, который используется как кофактор в большинстве реакций метилирова-

ния и является основным донором метильных групп для метилирования ДНК, РНК и хроматина [3, 9, 22]. SAM впоследствии превращается в S-аденозилгомоцистеин (SAH) через серию реакций трансметилирования. SAH затем при помощи аденозилгомоцистеиназы распадается на гомоцистеин, который может затем реметилироваться с получением L-Met метионинсинтазой (MS; EC 2.1.1.13) в присутствии N₅-метилтетрагидрофолата (N₅-MTHF) и кобаламина как кофактора полного метионинового цикла [3].

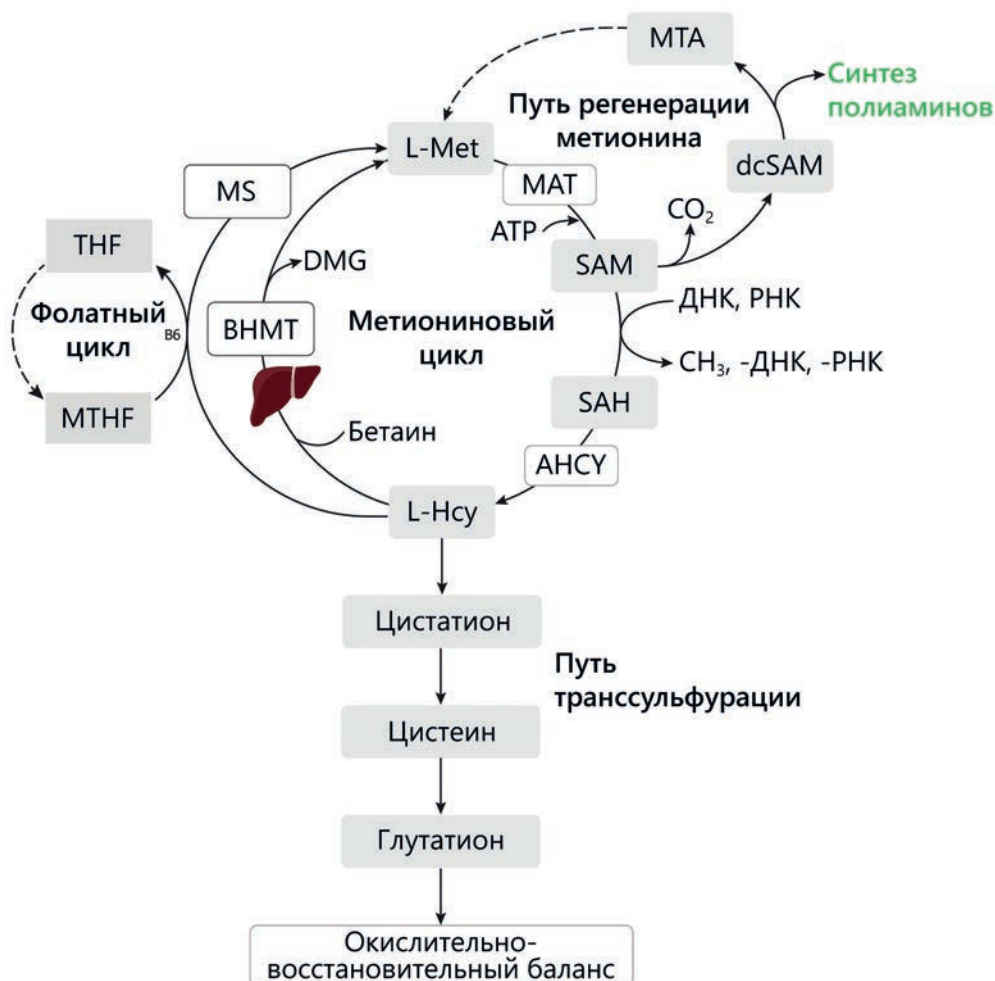
В нормальных условиях MS реметилирует приблизительно 50% L-Нсу с образованием L-Met во всех тканях. Активность MS необходима не только для реметилирования L-Нсу, но также и для поддержания клеточных уровней восстановленного тетрагидрофолата, который необходим для одноуглеродного метаболизма в клетках [3, 23]. L-Нсу может также быть реметилирован с использованием бетаина, который образуется из холина бетаингомоцистеин-S-метилтрансферазой (BHMT; EC 2.1.1.5), которая экспрессируется преимущественно в печени и почках и не зависит от присутствия фолатов [3].

Альтернативно, цистатион-бета-синтаза (EC 4.2.1.22) может преобразовывать L-Нсу в пути транссульфурации, где L-Нсу превращается в цистатион, который затем под действием цистатионазы (EC 4.4.1.1) превращается в цистеин, использующийся в синтезе глутатиона и поддержании окислительно-восстановительного баланса [3].

Низкий уровень L-Met — причина падения уровня SAM, который имеет следующие эффекты: (1) ингибирование ферментов BHMT и MTHFR и предотвращение активации цистатион-бета-синтазы для поддержания цикла L-Met [3]; (2) накопление 5-MTHF, который ингибирует глицин-N-метилтрансферазу и переключает потребление SAM на ДНК-метилтрансферазы [3]; и (3) преимущественное усиление экспрессии гена *MAT*, что говорит о том, что контроль за образованием SAM осуществляется для поддержания его постоянных клеточных уровней [3].

Восстановительные пути также восстанавливают L-Met, который необходим для синтеза полиаминов [3]. SAM декарбоксилируется и утилизируется в синтезе полиаминов [3]. Множественные ферментативные шаги требуются для преобразования метилтиоаденозина в метилтиорибозу и, в конечном счёте, в метилтиоксобутират (МТОВ).

Таким образом, биосинтез SAM контролирует сохранение клеточных концентраций SAM.



Обзор метаболизма L-Met: SAM, S-аденозилметионин; MAT, метионинаденозилтрансфераза; SAH, S-аденозилгомоцистеин; AHCY, аденозилгомоцистеиназа; MS, метионинсинтаза; BHMT, бетаин-гомоцистеин-S-метилтрансфераза; dcSAM, декарбоксилат SAM; MTA, метилтиоаденозин; DMG, диметилглицин; 5-MTHF, 5-метилтетрагидрофолат; и THF, тетрагидрофолат

Эти скоординированные взаимодействия позволяют клеткам поддерживать синтез белков и полиаминов и другие реакции метилирования для клеточного роста и выживания при диете с низким уровнем L-Met.

УЯЗВИМЫЕ МЕСТА МЕТАБОЛИЗМА ОПУХОЛИ: МЕТИОНИНОВАЯ ЗАВИСИМОСТЬ

Метиониновая зависимость является повсеместной и фундаментальной отличительной чертой раковых клеток [24, 25]. Метиониновая зависимость была впервые описана как неспособность опухолевых клеток выживать и расти при замене L-Met в культуральной среде на его предшественник L-Hcy [2, 8, 26–27].

В нормальных и некоторых опухолевых клетках активны естественные пути ресинтеза L-Met из L-Hcy с помощью метионинсинтазы,

тем не менее раковые клетки имеют повышенную потребность в её работе, поскольку используют чрезмерное количество L-Met для реакций трансметилирования и, таким образом, могут быть более уязвимы к дефициту L-Met [5, 27–28].

На сегодняшний день все изученные линии нормальных клеток показали отсутствие метиониновой зависимости и растут почти так же хорошо в среде $\text{Met}^- \text{Hcy}^+$, как и в среде $\text{Met}^+ \text{Hcy}^-$, несмотря на активный синтез L-Met из L-Hcy в раковых клетках [24, 25]. Из 23 исследованных клеточных линий различных типов злокачественных опухолей человека 11 вообще не растут в среде $\text{Met}^- \text{Hcy}^+$, таким образом, их можно считать полностью L-Met-зависимыми, и три клеточные линии дают в ней минимальный рост [24]. Впоследствии, используя чувствительность к METase как показатель метиониновой зависимости, все тестируемые раковые клеточные линии были идентифици-

рованы как зависимые от L-Met [25]. Согласно этим результатам, метиониновая зависимость часто наблюдается у многих видов опухолевых клеток человека, и предполагается, что это может быть важным фактором в онкогенной трансформации и терапевтической мишеню.

Позитронно-эмиссионная томография (ПЭТ) с [^{11}C]L-Met показала яркий сигнал и была более специфичной для обнаружения опухолевых клеток, чем изображения, полученные с [^{18}F]дезоксиглюкозой, представляя дополнительные доказательства того, что метиониновая зависимость характерна для всех типов раковых клеток [29]. Эти данные позволяют предположить, что различия потребности в L-Met между раковыми и нормальными клетками могут быть более выраженными, чем различия потребности в глюкозе.

Метиониновая зависимость раковых клеток обусловлена избыточной активацией реакций трансметилирования, которая, вероятно, является причиной гиперметилирования ДНК [22, 30], приводящего к анеуплоидии в опухолевых клетках [22, 30], или же гиперметилированием лизинового меток гистона H3 [27, 28].

В среде Met⁻ Hcy⁺ ингибирование роста L-Met-зависимых раковых клеток приводит к уменьшению доли делящихся клеток в популяции, в отличие от накопления клеток в фазе G₁ в культуре нормальных фибробластов при высокой плотности в среде с добавлением L-Met [31]. Ограничение L-Met останавливает раковые клетки в фазе S/G₂ клеточного цикла и приводит к гибели клоногенных клеток, которые эквивалентны иницирующим опухоль клеткам, и делает раковые клетки чувствительными к препаратам, специфически действующим на клеточный цикл [28, 31].

ОГРАНИЧЕНИЕ ПОСТУПЛЕНИЯ L-Met

Из-за окислительного стресса и гиперпролиферации, вызванной онкогенным перепрограммированием, раковые клетки имеют высокую потребность в L-Met. Когда происходит такое увеличение потребности в L-Met одновременно с ограничением его доступности, в результате окислительного стресса и отсутствия предшественников нуклеотидов проявляется метаболическая уязвимость, называемая метиониновой зависимостью, которая является отличительной чертой раковых клеток. Использование метиониновой зависимости при диете с низким содержанием L-Met показало многообещающие результаты у онкологиче-

ских больных. Ферменты, снижающие уровень L-Met, в монотерапии или в комбинации с диетой с низким содержанием L-Met и химиотерапевтическими препаратами имеют потенциал как новая парадигма в лечении рака [32].

Метионин-γ-лиаза (methioninase; EC 4.4.1.11, метиониназа, METase) является бактериальным пиридоксаль-5'-фосфат-зависимым ферментом, она катализирует гамма-элиминацию L-Met с образованием альфа-кетомасляной кислоты, метилмеркаптана и аммиака [33–35]. Впервые METase была использована для лечения рака в 1973 г. Kreis et al., когда на модели карциномы крыс Уокера-256 было показано ингибирование роста опухоли ферментом, выделенным из *Clostridium sporogenes* [36]. Этот фермент подавлял рост опухоли более эффективно, чем рацион без L-Met, и не вызывал потерю массы тела [36]. Однократное внутривенное введение METase истощало уровень L-Met в плазме крови до 8% от контрольного уровня [36]. Ген METase был клонирован из *Pseudomonas putida* и экспрессирован в *E. coli* [13], и было показано, что он эффективен против всех типов рака *in vitro* и *in vivo* [37–49]. Пегилированная рекомбинантная METase (rMETase) была использована *in vivo* для увеличения периода полувыведения и минимизации иммунологических реакций [50].

Единственным побочным эффектом внутривенного введения пегилированной rMETase у обезьян была непродолжительная анемия [50]. После внутривенной инъекции кофактор rMETase пиридоксаль-5'-фосфат (PLP) быстро диссоциировал, что привело к снижению активности фермента [50]. Наблюдавшиеся проблемы анафилаксии и диссоциации PLP rMETase были решены при помощи пероральной доставки rMETase (o-rMETase): при пероральном применении rMETase действует в желудочно-кишечном тракте без попадания в кровь. В моделях ортотопических ксено-трансплантатов (PDOX) у мышей o-rMETase продемонстрировала исключительную эффективность против рефрактерной саркомы, рака поджелудочной железы, рака толстой кишки и меланомы [40–43, 45].

КЛИНИЧЕСКИЕ НАБЛЮДЕНИЯ

Ранние клинические испытания рационов питания с ограничением L-Met с химиотерапией и без неё показали многообещающие результаты у некоторых пациентов с поздней стадией рака. С 1990-х гг. были проведены пилотные клинические испытания первой

Резюме клинических исследований METase

Заболевание (состояние)	Тип METase	Количество пациентов	Дозы и режимы применения	Комбинация с другими химио-терапевтическими препаратами	Развитие заболевания	Авторы
Прогрессирующий рак молочной железы	нерекомбинантная METase	3	От 5000 до 20 000 единиц путём внутривенной инфузии в течение 4 или 10 ч однократно	—	—	Tan et al. (1996) [51]
Рак лёгких, молочной железы, лимфома и рак почки на поздних стадиях	гMETase	9	От 5000 до 20 000 единиц в течение 6–24 ч путём внутривенной инфузии однократно	—	—	Tan et al. (1997) [34]
Прогрессирующий рак яичников и рак предстательной железы	о-гMETase	2	500 единиц о-гMETase ежедневно, разделённые на две пероральные дозы по 250 единиц в течение 1 мес. для пациента с раком яичников или 3 мес. для пациента с раком простаты	один пациент: пероральный приём дексаметазона и диета с низким содержанием L-Met	уровень PSA снизился, уровень гемоглобина повысился	Han et al. (2020) [20]
Прогрессирующий рак предстательной железы	о-гMETase	2	500 единиц о-гMETase ежедневно, разделённые на две пероральные дозы по 250 единиц в течение 1 мес.	один пациент: диета с низким содержанием L-Met	уровень PSA снизился	Han et al. (2021) [19]
Прогрессирующий рак предстательной железы	о-гMETase	1	500 единиц о-гMETase ежедневно, разделённые на две пероральные дозы по 250 единиц	—	уровень PSA стабилен	Han et al. (2021) [18]
IV стадия рака поджелудочной железы	о-гMETase	1	500 единиц о-гMETase ежедневно, разделённые на две пероральные дозы по 250 единиц в течение 19 мес.	FOLFIRINOX или FOLFIRI каждые две недели	уровень CA19-9 снизился; объём опухоли не изменился при компьютерной томографии	Kubota et al. (2022) [16]
Рак прямой кишки	о-гMETase	1	500 единиц о-гMETase ежедневно, разделённые на две пероральные дозы по 250 единиц в течение 18 мес.	диета с низким содержанием L-Met	уровень CEA снизился; объём опухоли не изменился при компьютерной томографии	Kubota et al. (2022) [15]
Инвазивная дольковая карцинома молочных желез	о-гMETase	1	250 единиц о-гMETase ежедневно каждые 6 ч в течение 6 мес.	диета с низким содержанием L-Met, доксорубицин и циклофосфамид в течение первых 3 мес., затем доцетаксел в течение следующих 3 мес.	уровень CEA снизился; объём опухоли не изменился при компьютерной томографии и МЕТРЕТ	Kubota et al. (2022) [17]

фазы для оценки цитотоксичности, фармакокинетики, истощения L-Met и определения максимальной переносимой дозы METase, rMETase [34, 51] и недавно появившейся o-rMETase [15–20].

Пробное клиническое испытание первой фазы с использованием нерекомбинантной METase *P. putida* показало отсутствие острой клинической токсичности или побочных эффектов после воздействия METase [51] в дозе менее 20 000 единиц при внутривенной инфузии в течение 10 ч. У пациента 1 (5000 единиц) и пациента 2 (10 000 единиц) с распространённым раком молочной железы истощение L-Met началось через 30 мин после начала инфузии и продолжалось 4 ч после её завершения. Значительное снижение уровня L-Met в сыворотке крови составило 19%, 35% и 50% в конце терапии у пациента 1, пациента 2 и пациента 3 (20 000 единиц в течение 10 ч внутривенной инфузии) соответственно [51]. Результат исследований показал наличие корреляции снижения L-Met с дозой rMETase и временем инфузии.

В другом клиническом исследовании первой фазы была использована rMETase, которая была клонирована из *P. putida* и экспрессирована в *E. coli*, для истощения пула L-Met в сыворотке крови пациентов с раком. Девять пациентов с поздней стадией рака лёгких, молочных желез, лимфомы и рака почки получали однократную внутривенную инфузию rMETase в дозах от 5000 до 20 000 единиц в течение 6–24 ч (таблица). Клинической токсичности не наблюдалось ни у одного пациента после лечения rMETase. Истощение L-Met началось в течение первого часа после начала инфузии rMETase и достигало максимума через 2 ч. Низкая концентрация L-Met сохранялась в течение всей инфузии и 2 ч с момента её окончания. L-Met у пациентов снижался до всего 0,1 мкМ в течение 2 ч, что сопоставимо с 300-кратным истощением без признаков токсичности [34]. Однако авторы не оценивали противоопухолевую активность этого лечения. Согласно этим результатам, rMETase безопасна при внутривенном введении и эффективно истощает свою биохимическую мишень — L-Met сыворотки крови.

Восемь пациентов с различными солидными опухолями, включая гормон-независимый рак простаты, рак яичников, рак поджелудочной железы, рак прямой кишки и инвазивный дольковый рак молочной железы, получали o-rMETase в качестве отдельной добавки или в комбинации с химиотерапевтическими агентами [15–20].

В ранних клинических исследованиях, проведённых Han et al. [18–20], уровень циркулирующего L-Met у 67-летней женщины с поздней стадией рака яичников снизился на 50% в течение 4 ч после приёма 250 единиц o-rMETase. Четырём взрослым пациентам с прогрессирующим раком простаты было назначено 500 единиц o-rMETase ежедневно, разделённых на 2 пероральные дозы по 250 единиц с разной продолжительностью введения. У пациента 1 уровень простат-специфического антигена (PSA) снизился на 70% с 2000 нг/мл в начале терапии до примерно 600 нг/мл в течение трёх месяцев приёма o-rMETase и дексаметазона перорально (таблица), оба препарата внесли вклад в снижение уровня PSA. За 4 нед. приёма o-rMETase у пациентов 2 и 3 произошло снижение уровня PSA на 38% и 20% соответственно, затем его уровень стабилизировался. Пациент 2 придерживался вегетарианской диеты с низким содержанием L-Met, что могло повлиять на уровни L-Met и PSA. Уровень L-Met у этого пациента снизился на 42,7% в течение 12 дней с использованием o-rMETase. За 6 недель до начала терапии у пациента 4 резко вырос уровень PSA с 38 до 56 нг/мл, но к 15 неделе после начала приёма o-rMETase его уровень стабилизировался на 62 нг/мл. Не наблюдалось клинической токсичности и других побочных эффектов ни у одного из пациентов с прогрессирующим раком предстательной железы после лечения o-rMETase отдельно или в комбинации с диетой с низким содержанием L-Met. Эти результаты позволяют предположить, что диета с низким содержанием L-Met, а также изменение дозы o-rMETase может помочь снизить уровни L-Met и PSA в крови, тем самым предотвращая прогрессию рака простаты.

Согласно статистике, лишь у около 5% пациентов с IV стадией рака поджелудочной железы, принимавших FOLFIRINOX, происходила стабилизация заболевания в течение 18 мес. с момента постановки диагноза [16]. В клиническом исследовании ограничение L-Met при помощи o-rMETase, принимаемой 2 раза в день как добавка к пище, и диеты с низким содержанием L-Met показало очевидно взаимоусиливающий эффект в комбинации с FOLFIRINOX или FOLFIRI каждые 2 недели. Для мониторинга прогрессирования заболевания использовался уровень ракового антигена 19-9 (CA19-9) в крови и компьютерная томография (таблица). У пациента с поздней стадией рака поджелудочной железы заболевание стабилизировалось, и он оставался живым через 19 мес. после постановки диагноза [16].

Другое клиническое исследование осуществлялось с участием пациентов с раком прямой кишки, в нём уровень L-Met снижали с помощью о-гМЕТase и диеты с низким содержанием L-Met. Уровень карциноэмбрионального антигена (СЕА) был стабилен в течение 18 мес. после начала терапии. Пациенты регулярно проходили ректороманоскопию, при которой измерялся размер опухоли (таблица). Согласно этим результатам, о-гМЕТase в качестве добавки к пище и диета с низким содержанием L-Met могут быть эффективны при раке толстой кишки с долгосрочной стабилизацией заболевания [15].

Ограничение L-Met при помощи о-гМЕТase каждые 6 ч в течение 6 мес. и диета с низким содержанием L-Met показали взаимоусиливающий эффект в комбинации с доксорубицином и циклофосфамидом, которые применялись первые 3 мес., затем с доцетакселом в течение последующих 3 мес., что привело к полному ответу, который ожидается менее чем у 10% пациентов с инвазивной дольковой карциномой молочных желез, получающих только неоадьювантную химиотерапию. Уровень СЕА в крови и компьютерная томография использовались для отслеживания развития заболевания, а полный ответ был продемонстрирован с помощью МЕТРЕТ через 6 мес., когда терапия была завершена (таблица) [17].

Ни в одном клиническом исследовании не было выявлено выраженной токсичности или побочных эффектов после длительного периода лечения с о-гМЕТase в виде добавки в дозе 500 единиц в день, разделённой на две пероральные дозы по 250 единиц. Эти результаты предполагают, что использование МЕТase может быть безопасной и эффективной стратегией снижения уровней циркулирующего и внутриклеточного L-Met без изменения диеты, тем самым ускоряя клиническое применение ограничения L-Met.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Из описанного выше можно сделать вывод, что о-гМЕТase является важным дополнением

в лечении пациентов с различными видами злокачественных новообразований. Благодаря отсутствию у о-гМЕТase поздних побочных эффектов и токсичности она становится идеальным агентом для стратегии комбинированной терапии поздних стадий рака. С наступлением эры о-гМЕТase иммуногенные осложнения, связанные со способом введения нативных форм фермента (внутривенные инъекции) и необходимостью частого введения, судя по всему, были устранены. Новые технологии сделали возможным проведение обширных фармакокинетических и фармакодинамических исследований о-гМЕТase, что даёт возможность разработать более эффективный режим дозирования препарата для клинического применения. Наилучшие результаты, по-видимому, достигаются посредством фармакологически направленной и индивидуальной терапевтической стратегии. Можно надеяться на скорую разработку деталей такой стратегии, что даст возможность полностью реализовать потенциал гМЕТase в клинической практике. Наконец, выявление L-Met-зависимых биомаркеров опухолей, таких как важные эпигенетические признаки, и более глубокое понимание клеточного ответа на ограничение L-Met в опухолевых клетках могут дать более эффективные методы борьбы с раком за счёт его уникальной метаболической уязвимости.

Вклад авторов. Вадим С. Покровский, Луай Або Кура и Елена А. Демидова — сбор и анализ информации, написание и редактирование рукописи, создание иллюстраций; Цинхун Хань и Роберт М. Хоффман — редактирование рукописи. Все авторы одобрили окончательный вариант рукописи до её представления к публикации.

Финансирование. Данное исследование поддержано государственной программой Министерства образования и науки, госзадание № 075-01551-23-00 (ФССП-2023-0006).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Данная статья не содержит исследований с участием людей или животных, проведённых кем-либо из авторов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sugimura, T., Birnbaum, S. M., Winitz, M., and Greenstein, J. P. (1959) Quantitative nutritional studies with water-soluble, chemically defined diets. VIII. The forced feeding of diets each lacking in one essential amino acid, *Arch. Biochem. Biophys.*, **81**, 448-455, doi: 10.1016/0003-9861(59)90225-5.
2. Hoffman, R. M., and Erbe, R. W. (1976) High *in vivo* rates of methionine biosynthesis in transformed human and malignant rat cells auxotrophic for me-

- thionine, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 1523-1527, doi: 10.1073/pnas.73.5.1523.
3. Kaiser, P. (2020) Methionine dependence of cancer, *Biomolecules*, **10**, 568, doi: 10.3390/biom10040568.
4. Coalson, D. W., Mecham, J. O., Stern, P. H., and Hoffman, R. M. (1982) Reduced availability of endogenously synthesized methionine for S-adenosyl-methionine formation in methionine-dependent cancer cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 4248-4251, doi: 10.1073/pnas.79.14.4248.
5. Stern, P. H., and Hoffman, R. M. (1984) Elevated overall rates of transmethylation in cell lines from diverse human tumors, *In Vitro*, **20**, 663-670, doi: 10.1007/BF02619617.
6. Stern, P. H., Mecham, J. O., Wallace, C. D., and Hoffman, R. M. (1983) Reduced free-methionine in methionine-dependent SV40-transformed human fibroblasts synthesizing apparently normal amounts of methionine, *J. Cell. Physiol.*, **117**, 9-14, doi: 10.1002/jcp.1041170103.
7. Singhal, T., Narayanan, T. K., Jacobs, M. P., Bal, C., and Mantil, J. C. (2012) ¹¹C-methionine PET for grading and prognostication in gliomas: a comparison study with ¹⁸F-FDG PET and contrast enhancement on MRI, *J. Nucl. Med.*, **53**, 1709-1715, doi: 10.2967/jnumed.111.102533.
8. Tisdale, M. J. (1980) Effect of methionine deprivation on methylation and synthesis of macromolecules, *Br. J. Cancer*, **42**, 121-128, doi: 10.1038/bjc.1980.210.
9. Hoffman, R. M. (1984) Altered methionine metabolism, DNA methylation and oncogene expression in carcinogenesis, *Biochim. Biophys. Acta BBA Rev. Cancer*, **738**, 49-87, doi: 10.1016/0304-419X(84)90019-2.
10. Hoffman, R. M., Coalson, D. W., Jacobsen, S. J., and Erbe, R. W. (1981) Folate polyglutamate and monoglutamate accumulation in normal and SV40-transformed human fibroblasts, *J. Cell. Physiol.*, **109**, 497-505, doi: 10.1002/jcp.1041090316.
11. Epner, D. E., Morrow, S., Wilcox, M., and Houghton, J. L. (2002) Nutrient intake and nutritional indexes in adults with metastatic cancer on a phase I clinical trial of dietary methionine restriction, *Nutr. Cancer*, **42**, 158-166, doi: 10.1207/S15327914NC422_2.
12. Hoshiya, Y., Guo, H., Kubota, T., Inada, T., Asanuma, F., Yamada, Y., Koh, J., Kitajima, M., Hoffman, R. M. (1995) Human tumors are methionine dependent *in vivo*, *Anticancer Res.*, **15**, 717-718.
13. Tan, Y., Xu, M., Tan, X., Tan, X., Wang, X., Saikawa, Y., Nagahama, T., Sun, X., Lenz, M., and Hoffman, R. M. (1997) Overexpression and large-scale production of recombinant L-methionine- α -deamino- γ -mercaptomethan-lyase for novel anticancer therapy, *Protein Expr. Purif.*, **9**, 233-245, doi: 10.1006/prep.1996.0700.
14. Stern, P. H., and Hoffman, R. M. (1986) Enhanced *in vitro* selective toxicity of chemotherapeutic agents for human cancer cells based on a metabolic defect, *J. Natl. Cancer Inst.*, **76**, 629-639, doi: 10.1093/jnci/76.4.629.
15. Kubota, Y., Han, Q., Hamada, K., Aoki, Y., Masaki, N., Obara, K., Tsunoda, T., and Hoffman, R. M. (2022) Long-term stable disease in a rectal-cancer patient treated by methionine restriction with oral recombinant methioninase and a low-methionine diet, *Anticancer Res.*, **42**, 3857-3861, doi: 10.21873/anticancer.15877.
16. Kubota, Y., Han, Q., Hozumi, C., Masaki, N., Yamamoto, J., Aoki, Y., Tsunoda, T., and Hoffman, R. M. (2022) Stage IV pancreatic cancer patient treated with FOLFIRINOX combined with oral methioninase: a highly-rare case with long-term stable disease, *Anticancer Res.*, **42**, 2567-2572, doi: 10.21873/anticancer.15734.
17. Kubota, Y., Han, Q., Masaki, N., Hozumi, C., Hamada, K., Aoki, Y., Obara, K., Tsunoda, T., and Hoffman, R. M. (2022) Elimination of axillary-lymph-node metastases in a patient with invasive lobular breast cancer treated by first-line neo-adjuvant chemotherapy combined with methionine restriction, *Anticancer Res.*, **42**, 5819-5823, doi: 10.21873/anticancer.16089.
18. Han, Q., and Hoffman, R. M. (2021) Chronic treatment of an advanced prostate-cancer patient with oral methioninase resulted in long-term stabilization of rapidly rising PSA levels, *In Vivo*, **35**, 2171-2176, doi: 10.21873/invivo.12488.
19. Han, Q., and Hoffman, R. M. (2021) Lowering and stabilizing PSA levels in advanced-prostate cancer patients with oral methioninase, *Anticancer Res.*, **41**, 1921-1926, doi: 10.21873/anticancer.14958.
20. Han, Q., Tan, Y., and Hoffman, R. M. (2020) Oral dosing of recombinant methioninase is associated with a 70% drop in PSA in a patient with bone-metastatic prostate cancer and 50% reduction in circulating methionine in a high-stage ovarian cancer patient, *Anticancer Res.*, **40**, 2813-2819, doi: 10.21873/anticancer.14254.
21. Cantoni, G. L. (1975) Biological methylation: selected aspects, *Annu. Rev. Biochem.*, **44**, 435-451, doi: 10.1146/annurev.bi.44.070175.002251.
22. Hoffman, R. M. (2015) Development of recombinant methioninase to target the general cancer-specific metabolic defect of methionine dependence: a 40-year odyssey, *Expert Opin. Biol. Ther.*, **15**, 21-31, doi: 10.1517/14712598.2015.963050.
23. Pokrovsky, V. S., Abo Qoura, L., Morozova, E., and Bunik, V. I. (2022) Predictive markers for efficiency of the amino-acid deprivation therapies in cancer, *Front. Med.*, **9**, 1035356, doi: 10.3389/fmed.2022.1035356.
24. Mecham, J. O., Rowitch, D., Wallace, C. D., Stern, P. H., and Hoffman, R. M. (1983) The metabolic defect of methionine dependence occurs frequently

- in human tumor cell lines, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **117**, 429-434, doi: 10.1016/0006-291X(83)91218-4.
25. Tan, Y., Xu, M., and Hoffman, R. M. (2010) Broad selective efficacy of recombinant methioninase and polyethylene glycol-modified recombinant methioninase on cancer cells *in vitro*, *Anticancer Res.*, **30**, 1041-1046.
 26. Yamamoto, J., Han, Q., Inubushi, S., Sugisawa, N., Hamada, K., Nishino, H., Miyake, K., Kumamoto, T., Matsuyama, R., Bouvet, M., Endo, I., and Hoffman, R. M. (2020) Histone methylation status of H3K4me3 and H3K9me3 under methionine restriction is unstable in methionine-addicted cancer cells, but stable in normal cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **533**, 1034-1038, doi: 10.1016/j.bbrc.2020.09.108.
 27. Yamamoto, J., Inubushi, S., Han, Q., Tashiro, Y., Sugisawa, N., Hamada, K., Aoki, Y., Miyake, K., Matsuyama, R., Bouvet, M., Clarke, S. G., Endo, I., and Hoffman, R. M. (2020) The linkage of methionine addiction, overmethylation of histone H3 lysines and malignancy demonstrated when cancer cells revert to methionine-independence, *bioRxiv*, doi: 10.1101/2020.12.04.412437.
 28. Wang, Z., Yip, L. Y., Lee, J. H. J., Wu, Z., Chew, H. Y., Chong, P. K. W., Teo, C. C., Ang, H. Y., Peh, K. L. E., Yuan, J., Ma, S., Choo, L. S. K., Basri, N., Jiang, X., Yu, Q., Hillmer, A. M., Lim, W. T., Lim, T. K. H., Takano, A., Tan, E. H., Tan, D. S. W., Ho, Y. S., Lim, B., and Tam, W. L. (2019) Methionine is a metabolic dependency of tumor-initiating cells, *Nat. Med.*, **25**, 825-837, doi: 10.1038/s41591-019-0423-5.
 29. Kubota, Y., Sato, T., Hozumi, C., Han, Q., Aoki, Y., Masaki, N., Obara, K., Tsunoda, T., and Hoffman, R. M. (2023) Superiority of [¹¹C] methionine over [¹⁸F] deoxyglucose for PET imaging of multiple cancer types due to the methionine addiction of cancer, *Int. J. Mol. Sci.*, **24**, 1935, doi: 10.3390/ijms24031935.
 30. Bloomfield, M., and Duesberg, P. (2016) Inherent variability of cancer-specific aneuploidy generates metastases, *Mol. Cytogenet.*, **9**, 90, doi: 10.1186/s13039-016-0297-x.
 31. Hoffman, R. M., and Jacobsen, S. J. (1980) Reversible growth arrest in simian virus 40-transformed human fibroblasts, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 7306-7310, doi: 10.1073/pnas.77.12.7306.
 32. Yamamoto, J., Han, Q., Simon, M., Thomas, D., and Hoffman, R. M. (2022) Methionine restriction: ready for prime time in the cancer clinic? *Anticancer Res.*, **42**, 641-644, doi: 10.21873/anticancer.15521.
 33. Tanaka, H., Esaki, N., and Soda, K. (1985) A versatile bacterial enzyme: L-methionine γ -lyase, *Enzyme Microb. Technol.*, **7**, 530-537, doi: 10.1016/0141-0229(85)90094-8.
 34. Tan, Y., Zavala, J., Han, Q., Xu, M., Sun, X., Tan, X., Tan, X., Magana, R., Geller, J., and Hoffman, R. M. (1997) Recombinant methioninase infusion reduces the biochemical endpoint of serum methionine with minimal toxicity in high-stage cancer patients, *Anticancer Res.*, **17**, 3857-3860.
 35. Hoffman, R. M. (2017) Is DNA methylation the new guardian of the genome? *Mol. Cytogenet.*, **10**, 11, doi: 10.1186/s13039-017-0314-8.
 36. Kreis, W., and Hession, C. (1973) Biological effects of enzymatic deprivation of L-methionine in cell culture and an experimental tumor, *Cancer Res.*, **33**, 1866-1869.
 37. Higuchi, T., Kawaguchi, K., Miyake, K., Han, Q., Tan, Y., Oshiro, H., Sugisawa, N., Zhang, Z., Razmjooei, S., Yamamoto, N., Hayashi, R., Kimura, H., Miwa, S., Igarashi, K., Chawla, S. P., Singh, A. S., Eilber, F. C., Singh, S. R., Tsuchiya, H., and Hoffman, R. M. (2018) Oral recombinant methioninase combined with caffeine and doxorubicin induced regression of a doxorubicin-resistant synovial sarcoma in a PDOX mouse model, *Anticancer Res.*, **38**, 5639-5644, doi: 10.21873/anticancer.12899.
 38. Higuchi, T., Oshiro, H., Miyake, K., Sugisawa, N., Han, Q., Tan, Y., Park, J., Zhang, Z., Razmjooei, S., Yamamoto, N., Hayashi, K., Kimura, H., Miwa, S., Igarashi, K., Bouvet, M., Chawla, S. P., Singh, S. R., Tsuchiya, H., and Hoffman, R. M. (2019) Oral recombinant methioninase, combined with oral caffeine and injected cisplatin, overcome cisplatin-resistance and regresses patient-derived orthotopic xenograft model of osteosarcoma, *Anticancer Res.*, **39**, 4653-4657, doi: 10.21873/anticancer.13646.
 39. Higuchi, T., Sugisawa, N., Yamamoto, J., Oshiro, H., Han, Q., Yamamoto, N., Hayashi, K., Kimura, H., Miwa, S., Igarashi, K., Tan, Y., Kuchipudi, S., Bouvet, M., Singh, S. R., Tsuchiya, H., and Hoffman, R. M. (2020) The combination of oral-recombinant methioninase and azacitidine arrests a chemotherapy-resistant osteosarcoma patient-derived orthotopic xenograft mouse model, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **85**, 285-291, doi: 10.1007/s00280-019-03986-0.
 40. Kawaguchi, K., Han, Q., Li, S., Tan, Y., Igarashi, K., Kiyuna, T., Miyake, T., Miyake, M., Chmielowski, B., Nelson, S. D., Russell, T. A., Dry, S. A., Li, Y., Singh, A. S., Eckardt, M. A. R., Unno, M., Eilber, F. C., and Hoffman, R. M. (2018) Targeting methionine with oral recombinant methioninase (o-rMETase) arrests a patient-derived orthotopic xenograft (PDOX) model of BRAF-V600E mutant melanoma: implications for chronic clinical cancer therapy and prevention, *Cell Cycle*, **17**, 356-361, doi: 10.1080/15384101.2017.1405195.
 41. Kawaguchi, K., Han, Q., Li, S., Tan, Y., Igarashi, K., Murakami, T., Unno, M., and Hoffman, R. M. (2019) Efficacy of recombinant methioninase (rMETase) on recalcitrant cancer patient-derived orthotopic xenograft (PDOX) mouse models: a review, *Cells*, **8**, 410, doi: 10.3390/cells8050410.

42. Kawaguchi, K., Higuchi, T., Li, S., Han, Q., Tan, Y., Igarashi, K., Zhao, M., Miyake, K., Kiyuna, T., Miyake, M., Ohshiro, H., Sugisawa, N., Zhang, Z., Razmjooei, S., Wangsiricharoen, S., Chmielowski, B., Nelson, S. D., Russell, T. A., Dry, S. M., Li, Y., and Hoffman, R. M. (2018) Combination therapy of tumor-targeting *Salmonella typhimurium* A1-R and oral recombinant methioninase regresses a BRAF-V600E-negative melanoma, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **503**, 3086-3092, doi: 10.1016/j.bbrc.2018.08.097.
43. Kawaguchi, K., Miyake, K., Han, Q., Li, S., Tan, S., Igarashi, K., Kiyuna, K., Miyake, M., Higuchi, T., Oshiro, H., Zhang, Z., Razmjooei, S., Wangsiricharoen, S., Bouvet, M., Singh, S. R., Unno, M., and Hoffman, R. M. (2018) Oral recombinant methioninase (o-rMETase) is superior to injectable rMETase and overcomes acquired gemcitabine resistance in pancreatic cancer, *Cancer Lett.*, **432**, 251-259, doi: 10.1016/j.canlet.2018.06.016.
44. Yoshioka, T., Wada, T., Uchida, N., Maki, H., Yoshida, H., Ide, N., Kasai, H., Hojo, K., Shono, K., Maekawa, R., Yagi, S., Hoffman, R. M., and Sugita, K. (1998) Anticancer efficacy *in vivo* and *in vitro*, synergy with 5-fluorouracil, and safety of recombinant methioninase, *Cancer Res.*, **58**, 2583-2587.
45. Oshiro, H., Tome, Y., Kiyuna, T., Yoon, S. N., Lwin, T. M., Han, Q., Tan, Y., Miyake, K., Higuchi, T., Sugisawa, N., Katsuya, Y., Park, J. H., Zang, Z., Razmjooei, S., Bouvet, M., Clary, B., Singh, S. R., Kanaya, F., Nishida, F., and Hoffman, R. M. (2019) Oral recombinant methioninase overcomes colorectal-cancer liver metastasis resistance to the combination of 5-fluorouracil and oxaliplatin in a patient-derived orthotopic xenograft mouse model, *Anticancer Res.*, **39**, 4667-4671, doi: 10.21873/anticancer.13648.
46. Morozova, E. A., Kulikova, V. V., Yashin, D. V., Anufrieva, N. V., Anisimova, N. Y., Revtovich, S. V., Kotlov, M. I., Belyi, Y. F., Pokrovsky, V. S., and Demidkina, T. V. (2013) Kinetic Parameters and Cytotoxic Activity of Recombinant Methionine γ -Lyase from *Clostridium tetani*, *Clostridium sporogenes*, *Porphyromonas gingivalis* and *Citrobacter freundii*, *Acta Naturae*, **5**, 92-98, doi: 10.32607/20758251-2013-5-3-92-98.
47. Morozova, E. A., Anufrieva, N. V., Davydov, D. Zh., Komarova, M. V., Dyakov, I. N., Rodionov, A. N., Demidkina, T. V., and Pokrovsky, V. S. (2017) Plasma methionine depletion and pharmacokinetic properties in mice of methionine γ -lyase from *Citrobacter freundii*, *Clostridium tetani* and *Clostridium sporogenes*, *Biomed. Pharmacother.*, **88**, 978-984, doi: 10.1016/j.biopha.2017.01.127.
48. Pokrovsky, V. S., Anisimova, N. Y., Davydov, D. Zh., Bazhenov, S. V., Bulushova, N. V., Zavilgelsky, G. B., Kotova, V. Y., and Manukhov, I. V. (2019) Methionine gamma lyase from *Clostridium sporogenes* increases the anticancer effect of doxorubicin in A549 cells and human cancer xenografts, *Invest. New Drugs*, **37**, 201-209, doi: 10.1007/s10637-018-0619-4.
49. Pokrovsky, V. S., Chepikova, O. E., Davydov, D. Zh., Zamyatnin, A. A., Lukashev, A. N., and Lukasheva, E. V. (2019) Amino acid degrading enzymes and their application in cancer therapy, *Curr. Med. Chem.*, **26**, 446-464, doi: 10.2174/0929867324666171006132729.
50. Yang, Z., Wang, J., Yoshioka, T., Li, B., Lu, Q., Li, S., Sun, X., Tan, Y., Yagi, S., Frenkel, E. P., and Hoffman, R. M. (2004) Pharmacokinetics, methionine depletion, and antigenicity of recombinant methioninase in primates, *Clin. Cancer Res.*, **10**, 2131-2138, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-03-0068.
51. Tan, Y., Zavala, J., Xu, M., Zavala, J., and Hoffman, R. M. (1996) Serum methionine depletion without side effects by methioninase in metastatic breast cancer patients, *Anticancer Res.*, **16**, 3937-3942.

METHIONINE ADDICTION OF CANCER CELLS TARGETED BY METHIONINASE

Review

V. S. Pokrovsky^{1,2,3*}, L. Abo Qoura^{1,2}, E. A. Demidova¹, Q. Han⁴, and R. M. Hoffman^{4,5}

¹ N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of Ministry of Health of Russian Federation, 115478 Moscow, Russia; e-mail: v.pokrovsky@ronc.ru

² Research Institute of Molecular and Cellular Medicine, People's Friendship University of Russia (RUDN University), 117198 Moscow, Russia; e-mail: louay.ko@gmail.com

³ Department of Biotechnology, Sirius University of Science and Technology, 354340 Sochi, Russia

⁴ AntiCancer Inc., San Diego, CA 92111, USA; e-mail: all@anticancer.com

⁵ Department of Surgery, University of California, San Diego, La Jolla, CA 92037-7400, USA

All types of cancer are addicted to methionine, which is known as the “Hoffman effect”. Restricting methionine inhibits the growth and proliferation of all tested types of cancer cells, while normal cells are unaffected. Methionine addiction is targeted with methioninase (METase), which has been shown to be effective and safe as a therapy for all types of cancer cells and animal cancer models, either alone or in combination with common cancer medications. Approximately six years ago, researchers developed a rMETase that may be taken orally as a supplement and has resulted in anecdotal positive results in patients with advanced cancer. Currently, there are 8 clinical studies on METase, including 2 from the 1990s and 6 more recent ones. This review focuses on the clinical studies of METase-mediated methionine restriction, specifically the oral dosage form of rMETase as a supplement alone or in combination with common chemotherapeutic agents in the treatment of patients with advanced cancer.

Keywords: methionine addiction, methionine γ -lyase, oral methioninase, Hoffman effect, clinical study, methionine restriction, methionine-degrading enzyme

ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ КОНЬЮГАТЫ НА ОСНОВЕ ЛИГАНДОВ ПРОСТАТИЧЕСКОГО СПЕЦИФИЧЕСКОГО МЕМБРАННОГО АНТИГЕНА КАК ЭФФЕКТИВНОЕ СРЕДСТВО ВИЗУАЛИЗАЦИИ ОПУХОЛЕЙ ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Обзор

© 2023 А.А. Успенская^{1*}, П.А. Красников¹, А.Г. Мажуга^{1,2,3},
Е.К. Белоглазкина¹, А.Э. Мачулкин^{1,4}

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, 119991 Москва, Россия; электронная почта: uspenskaya.n@gmail.com

² Университет науки и технологий МИСИС, 119049 Москва, Россия

³ Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева, 125047 Москва, Россия

⁴ Российский университет дружбы народов, 117198 Москва, Россия

Поступила в редакцию 02.02.2023

После доработки 17.05.2023

Принята к публикации 19.05.2023

Флуоресцентные красители находят широкое применение в гистологических исследованиях и в интраоперационной хирургии, в том числе против такого заболевания как рак предстательной железы (РПЖ), который на сегодняшний день является одним из самых распространённых видов онкологических новообразований среди мужчин. Адресная доставка флуоресцентных конъюгатов позволяет в значительной степени повысить эффективность диагностики и своевременно поставить правильный диагноз. В случае РПЖ белком-маркером является простатический специфический мембранный антиген (ПСМА). На сегодняшний день большое количество диагностических конъюгатов, направленных на ПСМА, создаётся на основе модифицированных мочевины. Обзор посвящён узконаправленным конъюгатам, селективно связывающимся с ПСМА, и отвечает на актуальные вопросы. Какие флуоресцентные красители уже используются в области РПЖ-диагностики? Какие факторы влияют на соотношение структура—активность конечной молекулы? На что стоит обратить внимание при выборе флуоресцентной метки для создания новых диагностических конъюгатов? И что можно предложить в данной области на сегодняшний день?

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: рак предстательной железы, простатический специфический мембранный антиген, ПСМА, флуоресцентные красители, адресная доставка.

DOI: 10.31857/S0320972523070084, EDN: FXJIKB

ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на значительные успехи современной науки в борьбе с онкологическими заболеваниями, рак до сих пор является одной из основных социально значимых проблем здравоохранения. Разработана большая палитра методов лечения и диагностики злокачественных новообразований: химиотерапия (в том числе адресно-направленная), иммунотерапия, диагностика и терапия с помощью

радиофармпрепаратов, гистологические исследования (биопсия), хирургическое вмешательство (трансплантация костного мозга, интраоперационная хирургия) и т.д. Гистологические исследования являются важнейшим методом диагностики, который позволяет точно установить природу тех или иных тканей. Зачастую постановка диагноза осуществляется именно на основании данного типа исследования. Разрабатывая эффективные, а главное доступные препараты-красители онкологических

Принятые сокращения: РПЖ – рак предстательной железы; ПСМА – простатический специфический мембранный антиген; DCL/ACUPA – N-[N-[(S)-1,3-дикарбоксипропил]карбамоил]-(S)-L-лизин; DOTA – додекантетрауксусная кислота; DURA – 2-[3-(1,3-дикарбоксипропил)уреидо]-пентадионовая кислота; MAG₃ – меркаптоацетилтриглицерин.

* Адресат для корреспонденции.

маркеров, мы можем ускорить и повысить пропускную способность, точность и надежность данного метода. Высокоселективные флуоресцентные конъюгаты имеют решающее значение и для интраоперационной хирургии. При синтезе новых конъюгатов, направленных на простатический специфический мембранный антиген (ПСМА), исследователю важно понимать, какие флуоресцентные красители уже были использованы для данной цели; что важно учитывать с точки зрения фармакокинетики конъюгатов; на какие физико-химические свойства флуоресцентных меток стоит обратить внимание и как они могут сказаться на биологической активности всей молекулы; какие синтетические подходы лучше всего себя зарекомендовали, а также какие новые актуальные направления можно предложить, опираясь на исследования последних 5 лет. Цель обзора — помочь исследователю ответить на данные вопросы.

ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ КОНЪЮГАТЫ НА ОСНОВЕ ЛИГАНДОВ ПРОСТАТИЧЕСКОГО СПЕЦИФИЧЕСКОГО МЕМБРАННОГО АНТИГЕНА

В силу того, что современные методы оптической визуализации не позволяют в полной мере идентифицировать изменения в тканях из-за невысокой проникающей способности видимого излучения, при амбулаторной диагностике используется, как правило, ПЭТ/КТ с соответствующими контрастными реагентами, содержащими радионуклидные метки. Однако использование радиофармпрепаратов для интраоперационной хирургии представляет ряд сложностей. Они связаны с получением, хранением и временем жизни радионуклидов, а также с продуктами их распада. Альтернативным методом визуализации злокачественных новообразований стало использование флуоресцентных красителей [1]. Преимуществами данных соединений являются: длительность хранения, скорость обнаружения, отсутствие радиоактивности, и, следовательно, не происходит облучения как пациента, так и персонала [2]. Тем не менее при создании диагностических конъюгатов на основе флуоресцентных красителей необходимо соблюдать диапазон окон прозрачности биологических тканей, чтобы избежать влияния их автофлуоресценции и поглощения самой тканью [3]. Оптимальными длинами волн как испускания, так и поглощения являются 2 интервала: 700–900 нм (первое окно ближнего инфракрасного диапа-

зона в биологической ткани, NIR-I) и 1000–1350 нм (второе окно прозрачности). К большому сожалению, автофлуоресценция сильно ограничивает область применения флуоресцентных красителей, и если при гистологии и исследованиях *in vivo* на мелких грызунах их использование не вызывает сложностей, то ввиду значительного объема человеческих тканей диагностика пациентов на сегодняшний день осуществляется, как правило, с использованием радиофармпрепаратов.

Согласно современной статистике по онкологическим заболеваниям среди мужчин, рак предстательной железы (РПЖ) находится на втором месте после рака лёгких [4]. Одним из белковых маркеров данного заболевания является ПСМА. Высокая экспрессия данного белка в злокачественных новообразованиях предстательной железы сделали его хорошей мишенью для направленной доставки биологически активных органических соединений.

В настоящее время существует два основных класса лигандов ПСМА: аналоги субстрата и аналоги переходного состояния. Аналогами переходного состояния являются фосфиновые кислоты (например, 2-(фосфонометил)-пентадионовая кислота (2-РМРА)) [5], и тиолы (например, 2-(3-меркаптопропил)-пентадионовая кислота (2-МРРА)) [6]. Ожидается, что первые диагностические конъюгаты с флуоресцентными агентами представлены на основе лигандов-векторов различного типа: как на основе аналогов переходного состояния, так и на основе аналогов субстрата. Последние представляют собой различные типы мочевины, но наибольшее распространение получили 2-[3-(1,3-дикарбоксипропил)уреидо]-пентадионовая кислота (DUPA) и N-[N-[(S)-1,3-дикарбоксипропил]карбамоил]-(S)-l-лизин (DCL) [7, 8]. С дальнейшим развитием векторов на основе мочевины и доказательств того, что такие лиганды обладают преимуществами перед лигандами-аналогами переходного состояния, стало синтезироваться большое количество конъюгатов на основе векторов аналогов субстрата. Преимущества обусловлены в основном фармакокинетическим профилем в условиях *in vivo*. Применение конъюгатов на основе аналогов переходного состояния требовало, как правило, очень больших доз (в силу недостаточной селективности), что вызывало опасения относительно побочных эффектов, в том числе связанных с иммунной системой [9]. DUPA и DCL стали самыми известными среди аналогов субстрата благодаря своей высокой специфичности к ПСМА. Попытки оптимизировать структуру путём замены аминокислот,

образующих мочевины, как правило, не приводило к «сверхаффинности». Например, замена лизина в структуре DCL на фрагмент диаминопимелиновой кислоты приводит к резкому ухудшению показателей аффинности [10].

Из большого разнообразия флуоресцентных красителей для создания конъюгатов против РПЖ чаще всего используются такие классы, как карбоцианины (Cy5, Cy7 и др.), флуоресцеины (FITC, FAM, FAM-5 и др.) и их аналоги. Главными требованиями к флуоресцентным меткам являются: удобный диапазон детектирования (видимый спектр), метаболическая стабильность, отсутствие токсичности. Их слабым местом, как и многих диагностических и терапевтических агентов, является специфичность на тот или иной тип ткани. Попадая в кровоток, будучи немодифицированными, такие вещества, как правило, либо быстро вымываются почками, либо распределяются по всему организму, не проявляя какой-либо специфичности. Конъюгирование диагностических агентов с векторными молекулами, направленными на простатический специфический мембранный антиген, даёт возможность получить эффективное средство визуализации РПЖ, а также некоторых других видов онкологии и их метастазов.

В данном обзоре термином «моноконъюгат» называются структуры, которые несут в себе по одному лиганду ПСМА и диагностическому агенту. Эти две основные части могут быть связаны между собой линкером, который, однако, может и полностью отсутствовать [11].

Активный центр ПСМА представляет собой два атома цинка, к которым ведёт воронкообразный туннель с различными гидрофобными или гидрофильными субкарманами. Если биологически активная молекула имеет небольшой размер, то, будучи соединённой с вектором, она (в составе конъюгата) без проблем войдёт в воронкообразную структуру белка, где дальше произойдёт связывание и поглощение конъюгата клеткой путём рецепторопосредованного эндоцитоза. Однако если структура диагностической метки массивная и разветвлённая, то при недостаточном расстоянии между ней и вектором возникнут стерические затруднения, которые не позволят вектору достигнуть активного центра, и вместо поглощения клеткой будет происходить вымывание конъюгата из тканей.

Чтобы лучше проследить динамику развития рассматриваемых соединений, остановимся на более ранних конъюгатах, полученных с использованием ингибиторов переходного состояния [12, 13]. В качестве векторной систе-

мы был взят лиганд GPI (2-[(3-амино-3-карбоксивпропил)(гидрокси)фосфинил)-метил]пентан-1,5-дионовая кислота) с показателем $K_i = 9$ нМ. Авторы отмечают резкое возрастание аффинности после конъюгирования ингибитора с флуоресцентной меткой до 0,4 нМ. Данный эффект следует объяснить следующим образом: как только конъюгат попадает в целевой белок, ингибитор GPI связывается с ним в активном центре. Флуоресцентная же часть, представленная IRDye78, остаётся и взаимодействует с субкарманами воронкообразного туннеля, тем самым обеспечивая дополнительную аффинность к ПСМА (рис. 1, а). Чтобы проверить это, авторы статьи провели исследование накопления немодифицированной метки. K_i в данном случае составило 500 нМ, что позволяет говорить о некотором неспецифическом накоплении. Стоит понимать, что структура красителя при этом всё равно является достаточно разветвлённой и массивной, и то, что в одном случае его молекула смогла проникнуть в белок-мишень, не гарантирует, что при незначительном изменении структуры будут достигнуты такие же высокие показатели связывания. Действительно, при проверке авторами других красителей наблюдалось следующее: чем меньше в структуре метки сульфогрупп, тем больше падала активность. Это показывает, что флуоресцентный краситель может выполнять две функции одновременно: обеспечивать визуализацию и повышать сродство конъюгата к ПСМА за счёт взаимодействия с ним.

Стоит отметить, что и немодифицированные флуоресцентные лиганды показывают весьма средние значения аффинности. Хорошая селективность конъюгатов относительно ПСМА-экспрессирующих клеток доказывает, что связывание обеспечивается и за счёт активной молекулы [14, 15]. Например, константа ингибирования для Cys-C(O)-Glu составляет 376 ± 195 нМ, а для 800CW-SCE она составляет $13,2 \pm 2,35$ нМ (рис. 1, б). Чем больше участков взаимодействия с активным центром ПСМА и ведущим к нему туннелю, тем большую эффективность стоит ожидать от конъюгатов.

Основываясь на данном наблюдении, были разработаны флуоресцентные красители, чувствительные к своему молекулярному окружению — молекулярные ротаторы [16, 17]. Такие структуры, будучи в несвязанном состоянии, не являются флуорофорами. Взаимодействуя с аминокислотными остатками, которые выстилают входную воронку ПСМА, меняется пространственное положение молекулярного ротатора, что переводит его во флуоресцентную

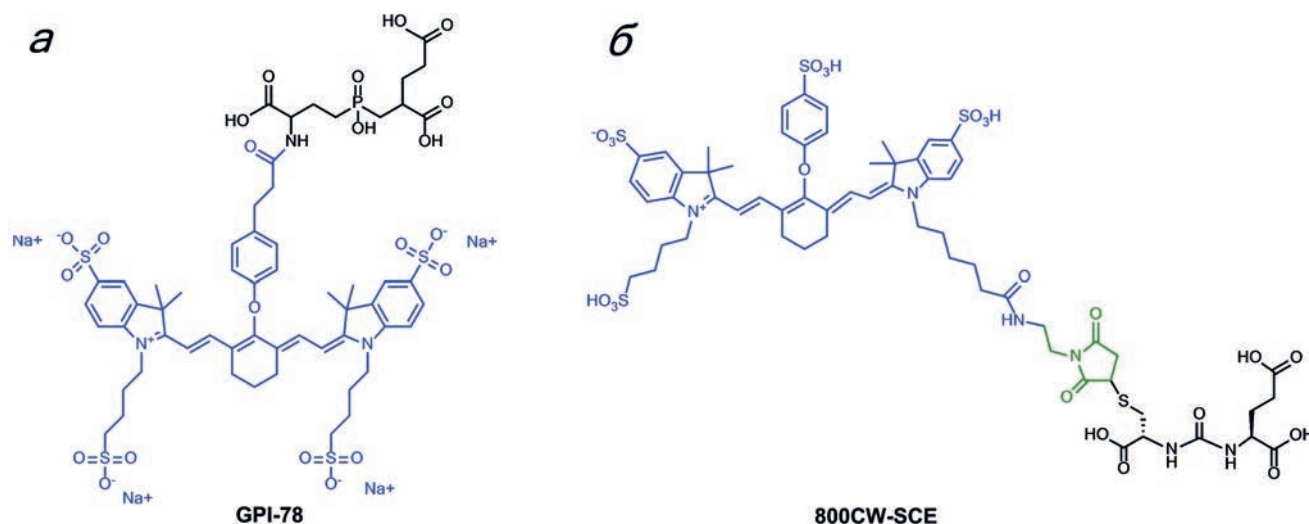


Рис. 1. Примеры структур флуоресцентных конъюгатов. *a* — Структура конъюгата GPI-78; *б* — структура конъюгата 800CW-SCE: лиганды ПСМА выделены чёрным цветом, линкеры — зелёным, флуоресцентные метки — синим

форму [18]. Такой пример мы можем видеть в недавней работе Zhang et al. [19], где в качестве лиганда была взята мочевиная DCL, а в качестве действующих агентов взяты метки ODA-436, ODA-490 и Glu-490 (рис. 2). Изучение внутримолекулярных взаимодействий показало, что связывание лиганда мочевины с активным центром ПСМА происходит согласно изученному механизму и не подвергается влиянию со стороны остальной части конъюгата. Активация ротора (вращения связей флуорофора под влиянием молекулярного окружения) происходит в непосредственной близости от активного центра, нитрильная группа ложится в глубокий карман, находящийся там, и относительно жёстко фиксирует молекулу во флуоресцирующем состоянии.

Главным преимуществом таких конъюгатов является то, что флуоресценция активируется только после связывания с белком-мишенью, и это даёт очень высокую контрастность визуализации за счёт увеличения разницы между фоновым накоплением метки в организме и злокачественным новообразованием. Помимо этого, соединения показывают очень высокую аффинность (63–118 пМ) на клеточных линиях LNCaP (ПСМА++) и 22Rv1 (ПСМА+). Однако имеются сложности в фармакологическом профиле *in vivo*, так как основное накопление происходило в почках или печени. В настоящее время ведутся исследования по решению данной проблемы. Трудности в биодоступности конъюгатов на основе антител могут быть обусловлены их разложением под действием различных протеаз, ответом иммунной системы и т.д. Возможно, авторам таких роторных флуоресцентных меток следует по-

менять антитело на низкомолекулярный вектор. Помимо хорошей устойчивости *in vivo*, низкомолекулярные лиганды обладают рядом других преимуществ. При сопоставимой с антителами аффинности их проще получить синтетически, такие синтезы можно масштабировать, при этом производство таких препаратов будет дешевле.

Вообще, система активации флуоресцентных меток непосредственно в опухолевых тканях активно набирает популярность. Интерес представляет работа 2022 года по получению флуоресцентных меток, производных родамина, которые активируются УФ-излучением уже непосредственно в опухолевых тканях [20]. Флуоресценция возникает в ходе радикального механизма: флуоресцентно неактивный ксантон преобразуется в четырёхчленный цикл. Донором радикалов выступает фрагмент диарилкетона, а акцептором — фрагмент стирила. Данные структуры позволяют проводить многочисленные модификации, причём некоторые из них значительно улучшают фотохимические свойства. Например, для некоторых соединений квантовый выход составляет 0,92. В работе проведены значительные исследования визуализации, начиная с изучения накопления в органеллах клетки (тубулиновые трубочки, митохондрии и лизосомы), заканчивая конъюгированием с векторными молекулами для селективного накопления в определённых клеточных линиях. Например, проводили исследование аффинности на клеточной линии U2OS (эпителиальные клетки остеосаркомы костей человека) конъюгатами меток PaX560 с самомаркирующимися белковыми метками HaloTag. Результаты показали

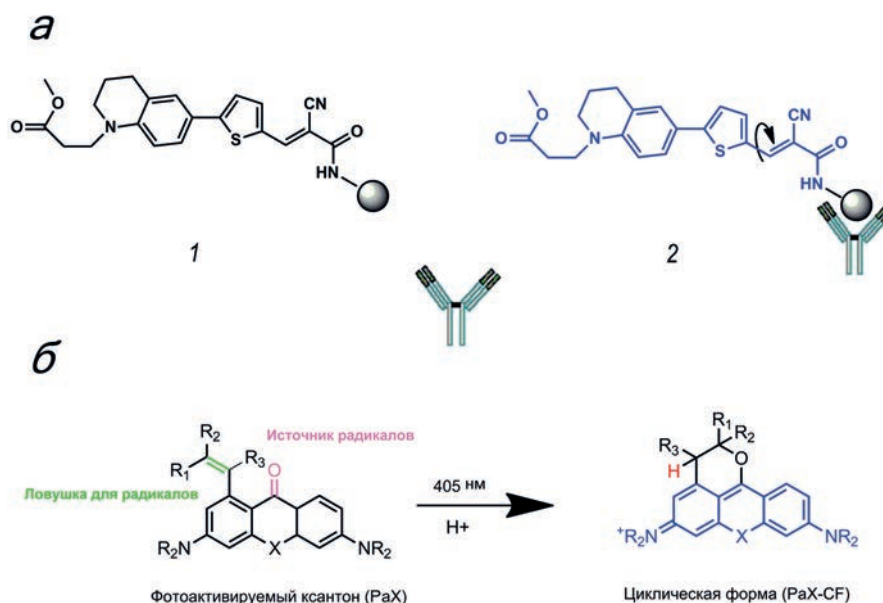


Рис. 2. Примеры флуоресцентных меток, способных переходить во флуоресцентное состояние под воздействием различных факторов. *a* – Схема работы молекулярных роторов при взаимодействии с ПСМА: 1 – конъюгат, не вступивший во взаимодействие с белком-мишенью, флуоресценция отсутствует; 2 – конъюгат, связанный с белком-мишенью, окружение белка меняет конфигурацию соединения, переводя его в состояние активной флуоресценции. *б* – Схема перехода ксантона (PaX) в активную циклическую форму по радикальному механизму. Флуоресцирующие формы выделены синим цветом

большую селективность и хорошее разрешение получаемой визуализации. Такие флуоресцентные фотоактивируемые метки очень интересны и имеют большой потенциал. Авторы статьи синтезировали несколько NHS-эфиров PaX-производных, что даёт возможность сконъюгировать их с ПСМА-направленными мочевидами, чего не было проделано в данном исследовании. Тем не менее создание конъюгатов PSMA-PaX является многообещающей задачей. Опираясь на уже проведённые исследования, стоит предположить, что введение таких меток в структуру конъюгатов ПСМА лучше осуществлять через пептидный линкер. Так как структура флуорофора под действием УФ-света изменяется, это может сильно сказаться на аффинности к белку, и если он уже внутри туннеля, то, возможно, эти изменения приведут к изменению аффинности. Имеет смысл провести моделирование и расчёты перед синтезом, чтобы лучше спланировать структуру таких конъюгатов. Так как на платформе ПСМА-векторов возможно создавать и бимодальные конъюгаты, с PaX-метками можно создавать двойные конъюгаты со стандартными флуоресцентными красителями, имеющими сходные спектральные свойства. Таким образом, можно достичь усиления сигнала и снизить влияние обесцвечивания, которое происходит со «всегда активными» красителями.

Итак, мы видим, что конъюгирование может привести как к так называемой «синергии» со стороны биологической активности, так и к абсолютно обратному эффекту. В лучшем случае мы получим биологическую активность конъюгата, сопоставимую с немодифицированным ингибитором. В худшем – мы можем получить полностью биологически неактивную молекулу, несмотря на то что до конъюгирования исходные составляющие показывали высокие показатели аффинности. В связи с этим другой эффективной стратегией будет введение линкера между векторной молекулой и красителем. Доказано, что конъюгаты такой структуры дают больше возможностей для применения и модификаций. Получив высокоаффинный к белку-мишени тандем, векторная молекула–линкер, можно легко менять биологически активную компоненту. И, например, после успешной визуализации, создать конъюгат с такой же адресной системой доставки, но уже с терапевтическим агентом. Безусловно, в фармакокинетических свойствах между диагностическими и терапевтическими конъюгатами будут наблюдаться некоторые отличия, тем не менее высокоаффинная платформа намного ускорит получение новой эффективной химиотерапии.

В синтетическом плане реализация таких структур не представляет большой сложности. Многие флуоресцентные красители весьма просто модифицировать алифатическими це-

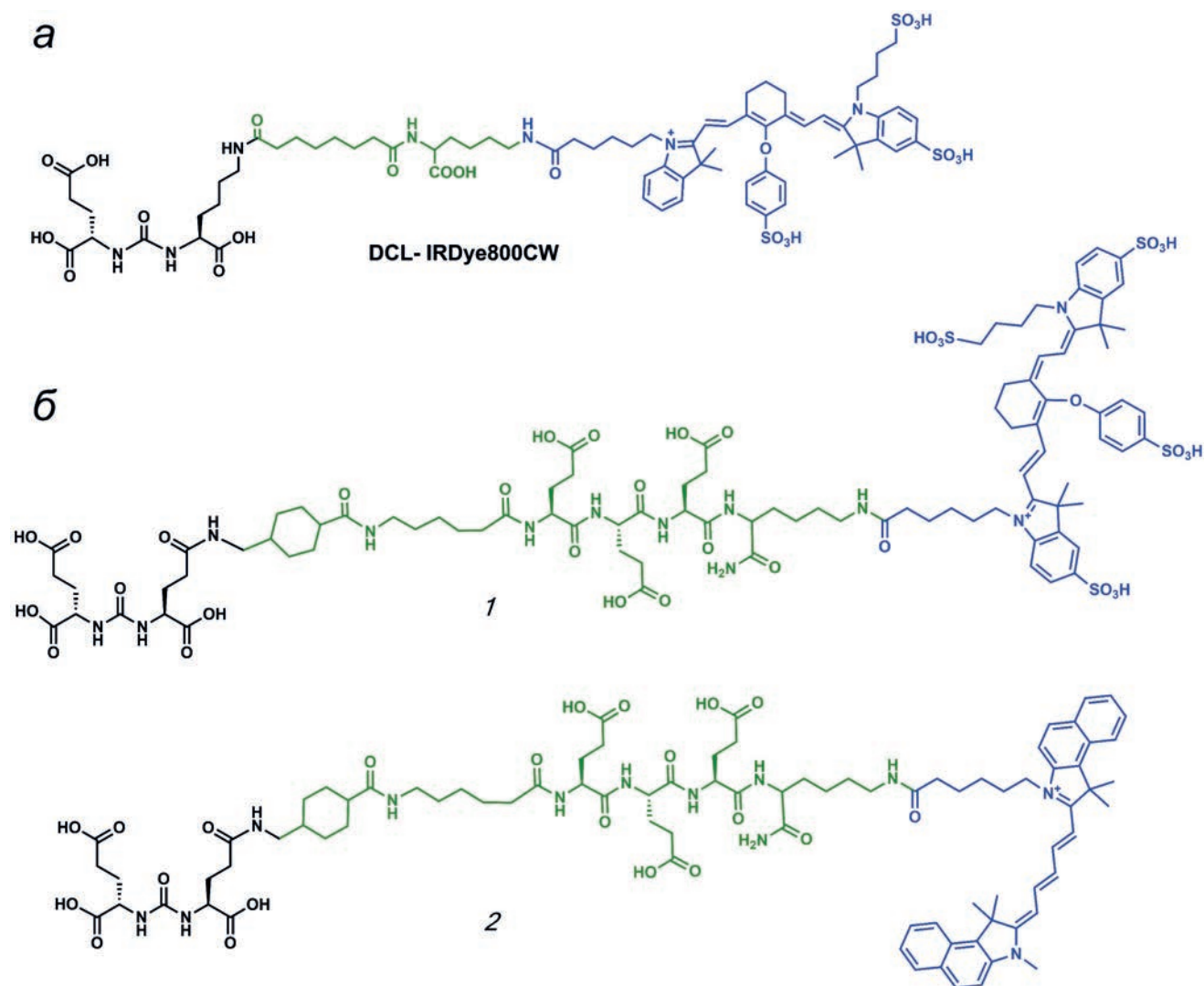


Рис. 3. Примеры флуоресцентных конъюгатов. *a* – Структура конъюгата DCL–IRDye800CW. *б* – Структуры конъюгатов на основе векторной молекулы DUPA (чёрный) с флуоресцентными красителями IRDye800 и Cy5.5 (синий). Лиганд ПСМА выделен чёрным цветом, флуоресцентная метка – синим

почками с различными функциональными группами, удобными для последующих реакций конъюгирования, например, путём клик-реакций азид-алкинового циклоприсоединения, реакций пептидного синтеза и др. При этом модификации практически абсолютно не сказываются на флуоресцентных характеристиках красителя (длина волны поглощения, длина волны эмиссии, Стоксов сдвиг и др.), но не стоит забывать о физико-химических свойствах, например, водорастворимости. Она является важнейшим критерием препаратов, потому что от неё зависит биодоступность веществ; оптимальная концентрация, вводимая в кровоток и др. Чтобы проходить через клеточные мембраны, конъюгат должен быть относительно неполярным, однако, чтобы хорошо растворяться в воде, в то же время конъюгат должен содержать в своём составе полярные

фрагменты. Оптимальный баланс полярности и растворимости является обязательным условием при создании новых биологически активных агентов. В настоящий момент большая палитра модифицированных для различных синтетических схем красителей является коммерчески доступной.

Рассматривая лиганды-векторы, направленные на РПЖ, можно отметить, что здесь также за последние 20 лет были достигнуты большие успехи. Синтетические подходы многогранны, их можно разделить на классический синтез в растворе и методы твердофазного синтеза. Последний набирает всё большую и большую популярность, так как позволяет значительно экономить время, уменьшать количество побочных продуктов, что немаловажно, учитывая высокие требования к чистоте конъюгатов для биологических испытаний.

Тем не менее не стоит вычёркивать из практики классический пептидный синтез в растворе. К его преимуществам можно отнести возможность контроля на промежуточных стадиях синтеза, реактивы в этом методе расходуются меньше, при этом, как правило, являются более коммерчески доступными. Помимо этого, в данном случае намного легче провести масштабирование синтеза.

Таким образом, можно подвести следующий итог относительно планирования синтеза ПСМА-лигандов. Если перед исследователем стоит задача получить большую библиотеку, представляющую собой варьирование того или иного элемента структуры, то предпочтительнее остановиться именно на твердофазных методах синтеза. Это позволит получить целевые соединения быстро, эффективно и в достаточном количестве для физико-химического анализа и биологических испытаний. Если же цель заключается в масштабировании и разработке нескольких заданных структур, то в этом случае более целесообразно выбрать классический пептидный синтез в растворе.

В обоих случаях синтез превращается в своего рода «конструктор», позволяющий собирать довольно массивные молекулы. Например, можно получить не просто направленную молекулу мочевины, а лиганд с уже присоединённой линкерной структурой, которую можно менять и корректировать, ограничиваясь только возможностями пептидного синтеза.

Первые линкеры в структурах ПСМА-лигандов представляли собой алифатические цепочки, которые выполняли исключительно функцию «моста». Флуоресцентный конъюгат с меткой IRD был получен в научно-исследовательской группе Chen et al. [21] (рис. 3, а). Конъюгат на основе ингибитора мочевины DCL и метки IRDye800CW получили классическим синтезом через NHS-эфиры.

Исследование *in vitro* и *in vivo* (модели ксенотрансплантатов на мышах) проводили на 2 клеточных линиях: PC-3-PIP (ПСМА +) и PC-3 (ПСМА –). Высокое накопление флуоресцентного сигнала в почках свидетельствует о выведении конъюгата через мочу. Также стоит отметить, что большое влияние оказывает подбор дозирования в условиях *in vivo*. Превышение дозы может приводить к неспецифическому окрашиванию ввиду естественного распределения препарата по кровяному руслу и тканям, в то время как доза должна быть подобрана так, чтобы сигнал от флуоресценции накапливался исключительно в экспрессирующих тканях в достаточных для детектирования количествах, а несвязанный препарат в кровя-

ном русле и тканях не превышал фоновых значений.

Тем не менее, опираясь на всё более подробные данные о строении ПСМА, а также уже имея представление о том, что сами флуоресцентные метки оказывают дополнительное взаимодействие, оставлять просто алифатический фрагмент в воронкообразном участке ПСМА является нецелесообразным. Введение ароматических или отрицательно заряженных групп в туннель перед активным центром улучшает аффинность, а значит имеет смысл ввести их и в структуру линкера.

В качестве хорошего примера стоит рассмотреть работу, в которой были получены конъюгаты с метками IRDye800 (1) и Cy5.5 (2) (рис. 3, б). В основу лиганда легла мочевиная DURA, которую модифицировали циклогексинным фрагментом с последующим введением трипептидной цепочки [22].

Лучшую аффинность показал конъюгат 1 с флуоресцентной меткой IRDye800, у которого значение IC_{50} составило $1,53 \pm 0,14$ нМ. Однако и конъюгат 2 с меткой Cy5.5 показал высокую аффинность ($IC_{50} = 2,07 \pm 0,13$ нМ). Это показывает, что лиганд с трипептидным линкером хорошо связывается с активным центром ПСМА, и полученные конъюгаты могут быть взяты на испытания *in vivo*. Исследования проводились на мышах с привитыми ксенографтами ПСМА положительных (PC-3-PIP) и отрицательных (PC-3-FLU) линий. Как конъюгат 1, так и конъюгат 2 показали отличную селективность связывания с ПСМА-положительными опухолями PC-3-PIP с более чем 10-кратной разницей накопления между опухолями PC-3-PIP и PC-3-FLU. Из-за разницы в полярности (IRDye800 содержит на 4 отрицательно заряженные сульфогруппы больше, чем Cy5.5) препараты имеют разный фармакокинетический профиль. Максимальная концентрация в опухоли PC-3-PIP конъюгата 1 достигается через 4 часа после введения, в то время для конъюгата 2 – через 24 часа. Выведение обоих конъюгатов происходит через почки. Конъюгат 1 с флуоресцентной меткой IRDye800 довольно быстро вымывался из опухоли – за 24–120 часов. В отличие от этого, конъюгат 2 с флуоресцентной меткой Cy5.5 остаётся связанным с опухолью довольно продолжительное время и практически не изменяется в течение 5 дней после введения. Связано это может быть с различной липофильностью меток, обусловленной количеством сульфокислых групп. Снижение липофильности в данном случае улучшает фармакокинетический профиль. Подтверждали высокую специфичность

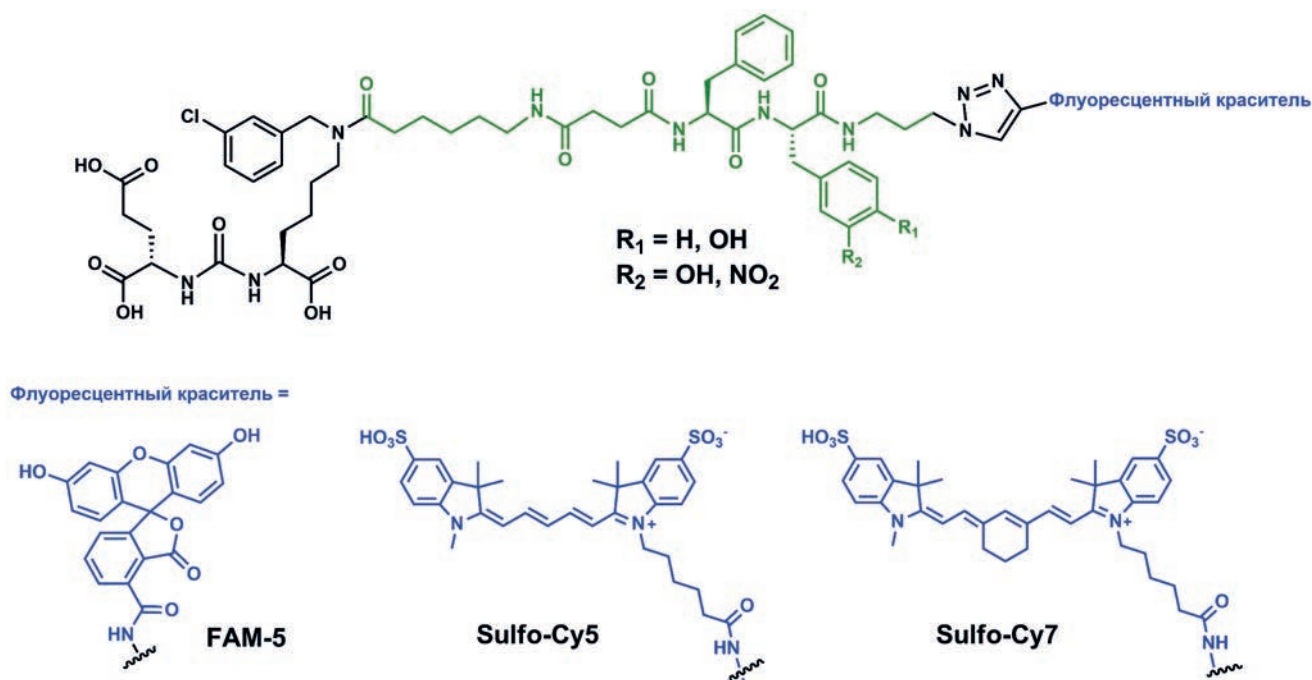


Рис. 4. Общая схема структуры флуоресцентных конъюгатов, полученных через реакцию азид-алкинового циклоприсоединения на основе векторной молекулы DCL (чёрный), линкером (зелёный) и флуоресцентными красителями FAM-5, Sulfo-Cy5, Sulfo-Cy7 (синий)

с помощью эксперимента с введением конъюгатов и 100-кратной дозы высокоаффинного конъюгата ПСМА ZJ-MCC-Ahx-YYYG [23]. В результате в обоих случаях практически не наблюдалось визуализации опухолевых тканей, а основное накопление флуоресцентных меток происходило в мочевом пузыре мышей. Мы видим, что для обеих структур значения IC_{50} сопоставимы и находятся в наномолярных пределах.

Варьирование флуоресцентных меток имеет важное значение, оно помогает использовать более широкую палитру красителей с различными физико-химическими свойствами, а, соответственно, расширяется и область применения. В целом, подход, который заключается в создании селективной к ПСМА базы с последующим применением разных флуоресцентных меток, можно видеть во многих других работах, что подтверждает его удобство. Отдельное место здесь занимают клик-реакции. Реакция азид-алкинового циклоприсоединения, катализируемая солями меди (I) обладает рядом преимуществ, такими как: высокая селективность затрагиваемых групп, простота в реализации, хорошие выходы реакций [24, 25].

С помощью данного синтетического подхода на основе модифицированной ароматическим фрагментом при атоме азота лизина мочевины была создана серия конъюгатов с флуоресцентными метками Sulfo-Cy5,

Sulfo-Cy7 и FAM-5 (рис. 4). Чтобы улучшить аффинность за счёт взаимодействия с воронкообразным туннелем, в структуру линкера были введены дипептидные фрагменты на основе фенилаланина и тирозина [26]. Без флуоресцентной нагрузки лиганды показывают наномолярные значения активности в пределах 1–5 нМ [27]. Благодаря своим спектральным характеристикам (длины волн поглощения: $\lambda_{\max}$ FAM-5 = 490 нм и $\lambda_{\max}$ Sulfo-Cy5 = 646 нм) PSMA-SulfoCy5 имеет больший потенциал при использовании в качестве визуализирующего агента. Обусловлено это ограничениями, возникающими из-за прозрачности тканей для видимого света. Sulfo-Cy5 имеет максимум поглощения при 646 нм и расположен на краю окна NIR-I (первое окно ближнего инфракрасного диапазона в биологической ткани – 700–900 нм) [28].

Исследование проводили методом проточной цитофлуориметрии на 3 клеточных линиях 22Rv1 (ПСМА +), LNCaP (ПСМА ++) и PC-3 (ПСМА –). Для конъюгата L-Phe-L-Tyr-FAM-5 результаты были следующими: для клеточной линии LNCaP 83,8% клеток несли флуоресцентный сигнал; 22Rv1 были окрашены на 14,4%; наименьшее количество флуоресцентного сигнала несли клетки PC-3 – 7,6%. Для того чтобы подтвердить, что низкое накопление конъюгата на клеточной линии 22Rv1 связано с низкой экспрессией ПСМА в самих клетках, был проведён эксперимент по

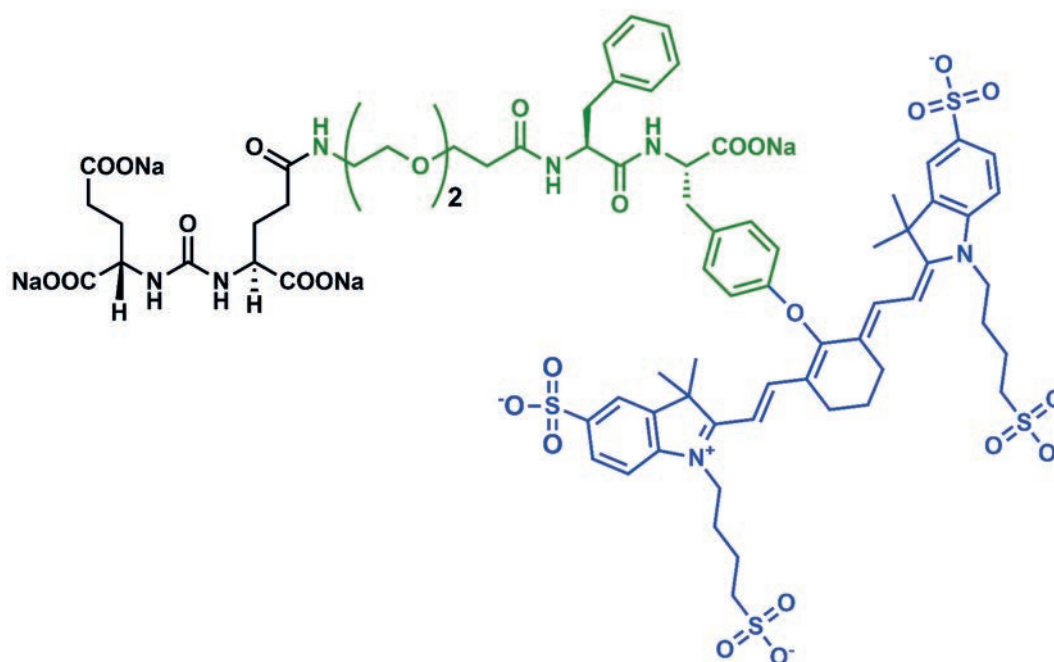


Рис. 5. Структура флуоресцентного конъюгата OTL7819, лиганд выделен чёрным цветом, линкер — зелёным, флуоресцентный краситель — синим

методике «блокирования». Для этого клеточные линии предварительно инкубировали в течение часа с лигандом L-Phe-L-Tyr, на основе которого были получены конъюгаты, но без флуоресцентной метки, с целью связать активные центры ПСМА. В результате накопление в клеточных линиях снизилось, особенно это заметно на ПСМА-положительной линии с высокой экспрессией — LNCaP. Таким образом, подтверждается, что окрашивание клеток происходит за счёт связывания конъюгатов с ПСМА. Полученные конъюгаты не были токсичны по отношению к клеточным линиям LNCaP и PC-3, за исключением конъюгата L-Phe-L-Tyr-Sulfo-Cy7, значения цитотоксичности которого составили 12,2 мкМ и 18,7 мкМ соответственно.

Для визуализации накопления флуоресцентного сигнала полученных конъюгатов *in vivo* была выбрана модель ксенотрансплантатов на мышах 22Rv1 и PC-3. В течение первого часа после введения препарата достоверных отличий между поглощением ПСМА-положительной и ПСМА-отрицательной опухолей не наблюдалось. Значительная разница стала наблюдаться по истечении 24 часов. Так как после введения большая часть конъюгата находилась в кровотоке, в первые часы наблюдалось увеличение фонового сигнала, который постепенно снижался по мере накопления в тканях и выведения из организма почками с мочой. Таким образом, за 24 часа из организма выводится весь неспецифически связанный

конъюгат. Поглощение наблюдалось только в тканях, экспрессирующих ПСМА, в частности, в ксенотрансплантатах 22Rv1. В этой области увеличение интенсивности сигнала происходило более чем в 2 раза.

Так как кожа и ткани активно поглощают свет, что приводит к ослаблению сигнала, в связи с этим дополнительно было проведено исследование *ex vivo*. Такие условия приближены к условиям интраоперационной диагностики при эксплоративной хирургии. Анализ поглощения *ex vivo* показал ещё большую разницу в накоплении сигнала. Среднее поглощение конъюгата в опухолях 22Rv1 было в 14 ± 2 раза выше, чем в опухолях PC-3.

Кроме того, стоит отметить, что в сравнении с недавно опубликованными работами была продемонстрирована хорошая визуализация на клеточной линии 22Rv1 с обоими конъюгатами при значительно меньшей дозе введения — 5 нмоль в 100 мкл (для конъюгата OTL7819 доза введения составляет 10 нмоль в 100 мкл) (рис. 5) [29].

Использование дипептидных цепочек на основе фенилаланина можно наблюдать и в других работах (рис. 6). На основе такого лиганда была получена серия диагностических конъюгатов на основе лиганда мочевины DUPA и меток DyLight680, IR800CW и Alexa Fluor 647 [30].

Соединение DyLight680 показало аффинность $K_i = 33$ нМ, Alexa Fluor — 4,5 нМ, IR800CW — 12 нМ. Примечательным данное

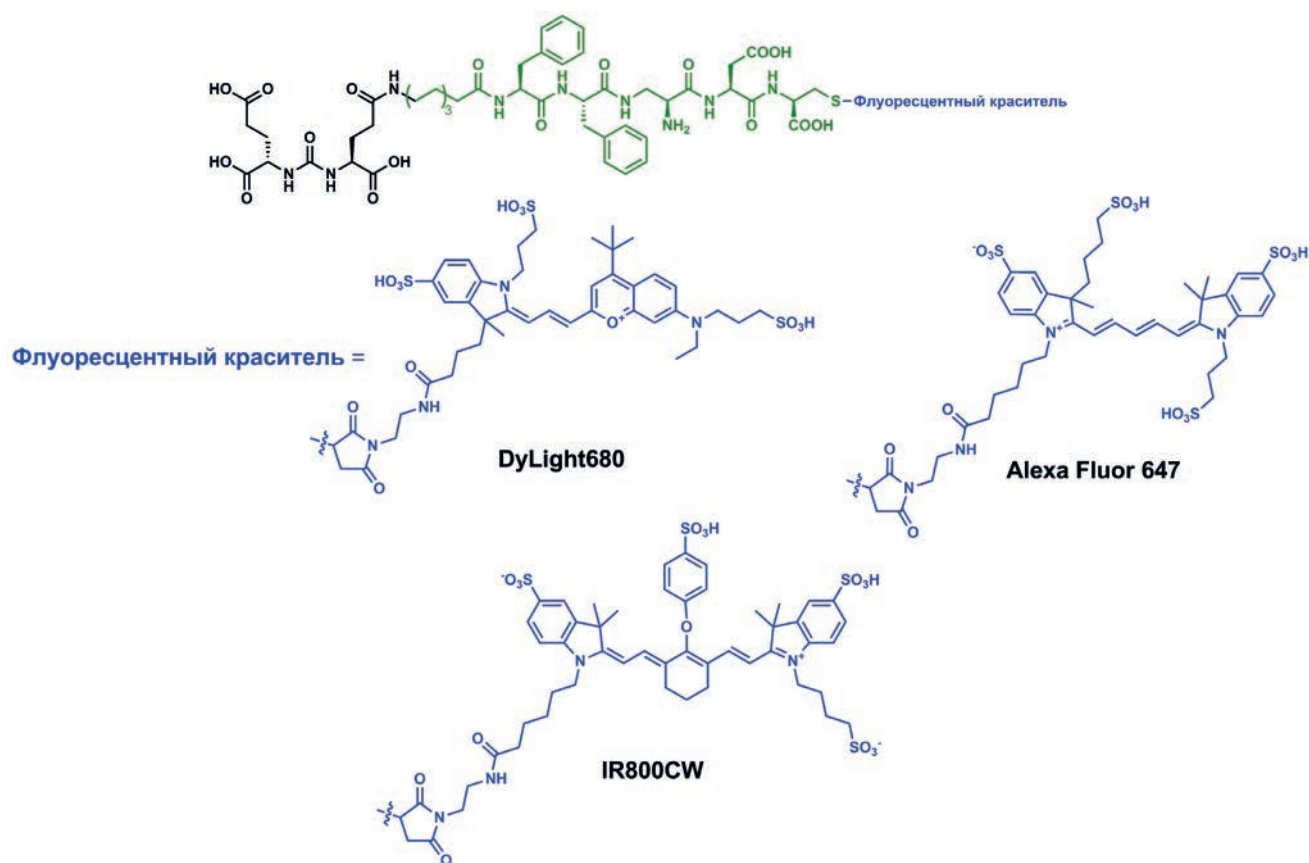


Рис. 6. Структура конъюгатов на основе векторного фрагмента DUPA (чёрный) и красителей DyLight680, Alexa Fluor 647 и IR800CW (синий) и полипептидного линкера (зелёный)

исследование делает то, что, помимо накопления в ПСМА-экспрессирующих ксенографтах, авторы провели эксперимент с изучением метастазирования. Для этого мышам внутрисердечно вводились опухолевые клетки 22Rv1 (ПСМА +), после чего мыши жили 4 недели с зарождающимися опухолями. Затем проводили введение флуоресцентных конъюгатов, умерщвление и визуализацию. Лиганды показали хорошее накопление в метастазах, значения аффинности практически не изменялись при переходе от метки к метке, что говорит о том, что структура метки находится вне области взаимодействия с белком-мишенью, и связывание хорошо обеспечивается векторной молекулой и линкером, а учитывая, что количество сульфоксильных групп в метках сопоставимо, нет большой разницы и в фармакокинетическом профиле. Таким способом, удалось визуализировать метастазы до 50 мкм с помощью камер высокого разрешения.

Помимо метастазов, ПСМА экспрессируется и в некоторых других случаях онкологических заболеваний, в том числе раке молочной железы, колоректальном раке, папиллярной почечно-клеточной карциноме. Здесь стоит сказать, что другое название ПСМА — глута-

маткарбоксипептидаза II (GCP-II), и он присутствует и в здоровых клетках, отвечая за метаболизм фолиевой кислоты и гидролиз N-ацетиласпартилглутамата. Также GCP-II присутствует в мозге и ЦНС, и в этом случае обозначается как N-ацетил-L-аспартил-L-глутаматпептидаза I (NAALADase I). Повышение уровня ПСМА при перечисленных выше типах онкологии, как правило, предвещает более неблагоприятный прогноз и тяжёлое протекание болезни. В то же время ПСМА становится ещё одним маркером, к которому разработано большое количество конъюгатов для визуализации и лечения, что может помочь таким пациентам. На сегодняшний день попытки визуализации ПСМА при не простатическом раке были сделаны с применением радиофармацевтических конъюгатов, таких как [^{18}F]-DCFPyL, [^{68}Ga]-PSMA-HBED-CC, и др., в силу возможности применения ПЭТ/КТ [31, 32]. Но для гистологических исследований и интраоперационной хирургии здесь также более предпочтительны флуоресцентные конъюгаты, направленные на ПСМА.

Итак, конъюгаты с флуоресцентными красителями представляют собой большой пласт диагностических препаратов для визуализации

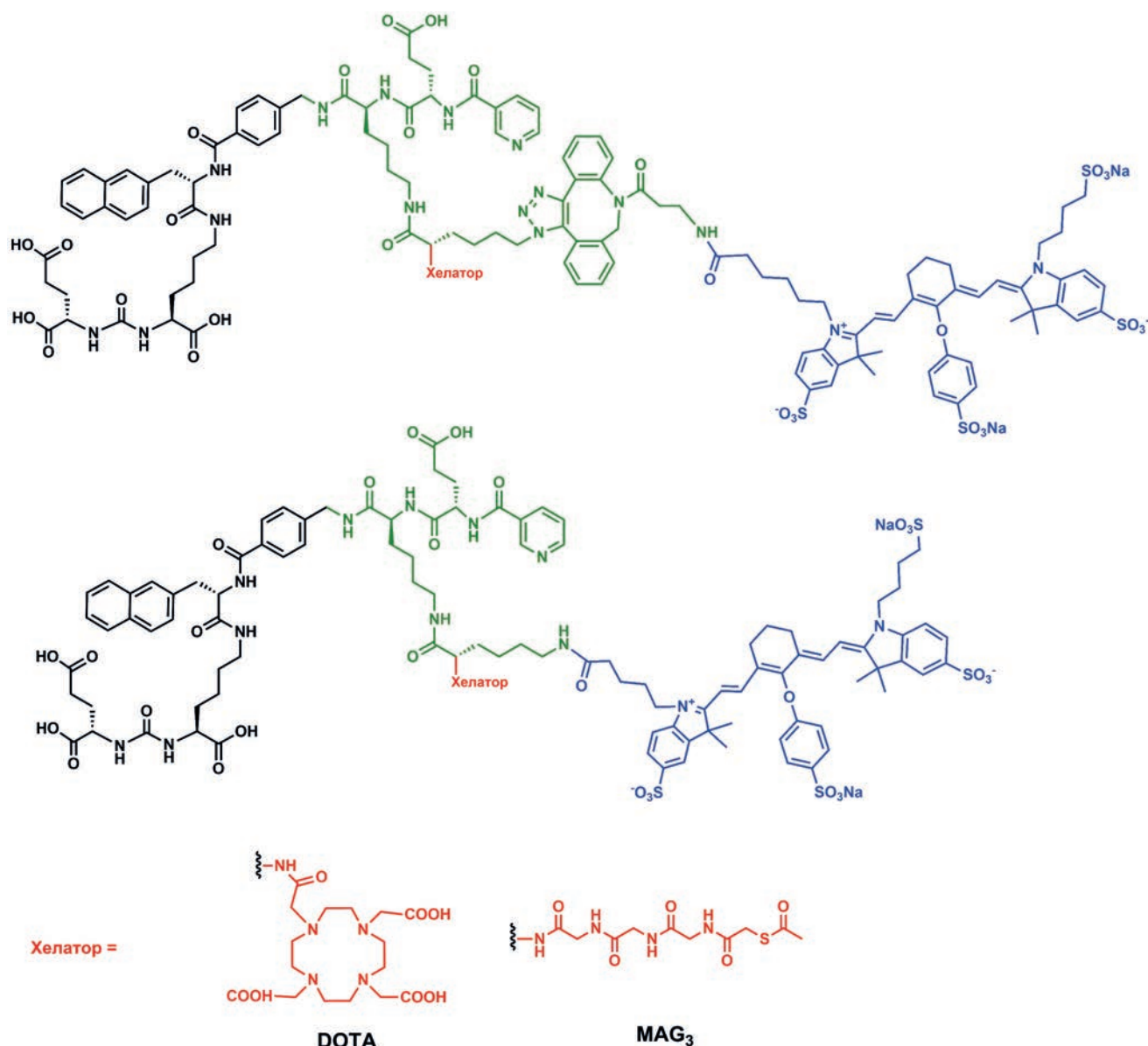


Рис. 7. Структуры разветвлённых двойных конъюгатов с флуоресцентной меткой IRDye800CW (синий) и хелатирующими агентами DOTA и MAG₃ (красный) на основе мочевины DCL (чёрный). Линкер выделен зелёным цветом

РПЖ и его метастазов. Они обладают преимуществами относительно радиофармацевтических препаратов, незатруднительны в синтетическом плане и являются перспективной альтернативой конъюгатам с радионуклидами. На что ещё стоит обратить внимание при выборе флуоресцентного красителя?

Помимо аффинности к белку-мишени лиганда-вектора, эффективность флуоресцентного конъюгата также определяется и другими физико-химическими показателями, например, квантовым выходом. Если данный параметр имеет высокое значение, то высокое накопление сигнала можно достичь не только за счёт связывания достаточного количества конъюгата с белком. В идеализированных условиях

значение квантового выхода должно стремиться к 1, однако данный параметр сильно зависит от множества факторов: растворителя, температуры, pH, структуры молекулы. Конверсия внутренних колебаний флуорофора зависит от структуры: чем жёстче структура, тем выше квантовый выход. В качестве примера можно привести пару флуоресцеина (квантовый выход равен 0,79) и фенолфталейна (квантовый выход равен 0,15), где структура первого соединения содержит на одну циклическую систему больше [33]. На другие факторы (температура, pH, растворители) в условиях биологических систем повлиять значительно труднее. Например, безызлучательные процессы можно снизить за счёт перехода на дейтерированные

растворители или увеличения их вязкости. Высокие квантовые выходы можно достичь при экстремально низких температурах, при которых уже не протекают биологические процессы. Также биологическая среда сильно ограничивает интервал допустимых значений pH. Таким образом, для увеличения показателей конъюгатов в плане квантового выхода и фотостабильности предпочтительнее брать флуоресцентные структуры с жёстким структурным скелетом, содержащим прочные связи и/или несколько циклических систем.

Несколько слов стоит сказать о двойных конъюгатах, которые позволяют объединить в одну молекулу несколько фрагментов, выполняющих разные функции. Использование конъюгатов двойного назначения в диагностике признано обеспечить как радио-, так и флуоресцентную визуализацию, что может быть очень полезным при таком методе терапии, как интраоперационная хирургия. Использование бимодальных конъюгатов позволяет проводить контроль опухоли на этапе диагностики, во время хирургического вмешательства, а также в постоперационный период. Применение в этом случае одного и того же диагностического селективного агента позволит уменьшить количество побочных эффектов, облегчить выбор врачом лекарственных препаратов для диагностики. Использование двойных конъюгатов с хелатирующим агентом и флуоресцентной меткой призвано помочь определить нахождение ПСМА-экспрессирующих тканей после [^{18}F]-ПЭТ.

Конструкция двойных конъюгатов, как правило, представлена двумя типами: разветвлённые, где сочленение происходит за счёт линкера с несколькими связующими участками, и последовательные, в которых один из функциональных фрагментов выступает в качестве элемента соединения для двух других, например, флуоресцентный краситель связан с векторной системой с одной стороны, а с другой — с биологически активной молекулой (например, хелатором). Как правило, такие конъюгаты представлены диагностическими агентами двух типов: направленные как на радиодетектирование, так и на флуоресцентное накопление [34]. Но встречаются сочетания флуоресцентного красителя и терапевтического препарата [11]. Флуоресцентный краситель в работе с диагностическими агентами двух типов представлен меткой IRDye800CW, хелатирование проводилось DOTA или меркаптоацетилтриглицином (MAG_3) (рис. 7).

Радиомечение полученных лигандов проводили ^{111}In для конъюгатов с хелатором DOTA

(радиоактивный выход составляет 93%) (N48 и N50) и $^{99\text{m}}\text{Tc}$ — для конъюгатов с хелатором MAG_3 (радиоактивный выход составляет 15–69%). Авторам удалось доказать стабильность полученных конъюгатов в сыворотке крови человека. Использование MAG_3 также приводит к увеличению липофильности, что может сказаться на поглощении, и существенно затрудняет синтез.

Наилучшую липофильность показали конъюгаты с дибензоциклооктеновой группой. Log D [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]-N49 составил $-2,4$ по сравнению с $-3,5$ для его эквивалента на основе NHS $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -N51 ($p < 0,01$). Log D [^{111}In]-N48 (SPAAC — реакция, промотируемая напряжением) составил $-3,2$ по сравнению с $-4,4$ для [^{111}In]-PSMA-N50 (NHS) ($p < 0,001$).

Исследование *in vitro* проводили на клеточных линиях LS174T-PSMA (PSMA +) и LS174T-WT (PSMA –). Все четыре лиганда показали специфическое связывание, доказанное экспериментом с предварительной блокировкой ПСМА с помощью избытка 2-PMPA. Однако накопление конъюгатов N48 и N49 (содержащих дибензоциклооктеновую группу) было весьма невысоким в сравнении с конъюгатами, полученными через NHS-эфиры: $3,9 \pm 0,5\%$ — для [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]-N49 и $8,9 \pm 0,6\%$ — для [^{111}In]-N48, по сравнению с NHS-конъюгированными вариантами; $22,9 \pm 1,6\%$ — для [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]-N51 и $17,2 \pm 3,5\%$ — для [^{111}In]-N50. В качестве конъюгата сравнения был использован [^{111}In]-PSMA-617, накопление которого составило $13,4 \pm 3,5\%$. Но стоит отметить, что при этом для всех четырёх лигандов не наблюдалось неспецифического связывания. Тем не менее при конъюгировании с радиоактивной меткой стоит понимать, что свойства биологической активности могут поменяться. Более низкое сродство, чем у PSMA-617, авторы также связывают с более сложной структурой конъюгатов, которая приводит к большей интернализации, что, впрочем, может поспособствовать увеличению времени удержания конъюгатов.

Результаты исследования *in vivo* также показывают специфическое поглощение ПСМА-положительными клеточными линиями, сопоставимое с конъюгатами сравнения PSMA-617, PSMA-I&T и PSMA-1007, о которых сообщается в литературе. Поглощение вышеперечисленных молекул варьируются от 5 до 13% ID/g (LNCaP, $\frac{1}{2}$ часа после введения). Опухолевое поглощение N49 (9% ID/g) было в схожем интервале, а поглощение N48 (21% ID/g) было, возможно, даже выше (LS174T-PSMA, 2 часа после введения). Стоит отметить, что в данной работе авторы использовали клеточную линию

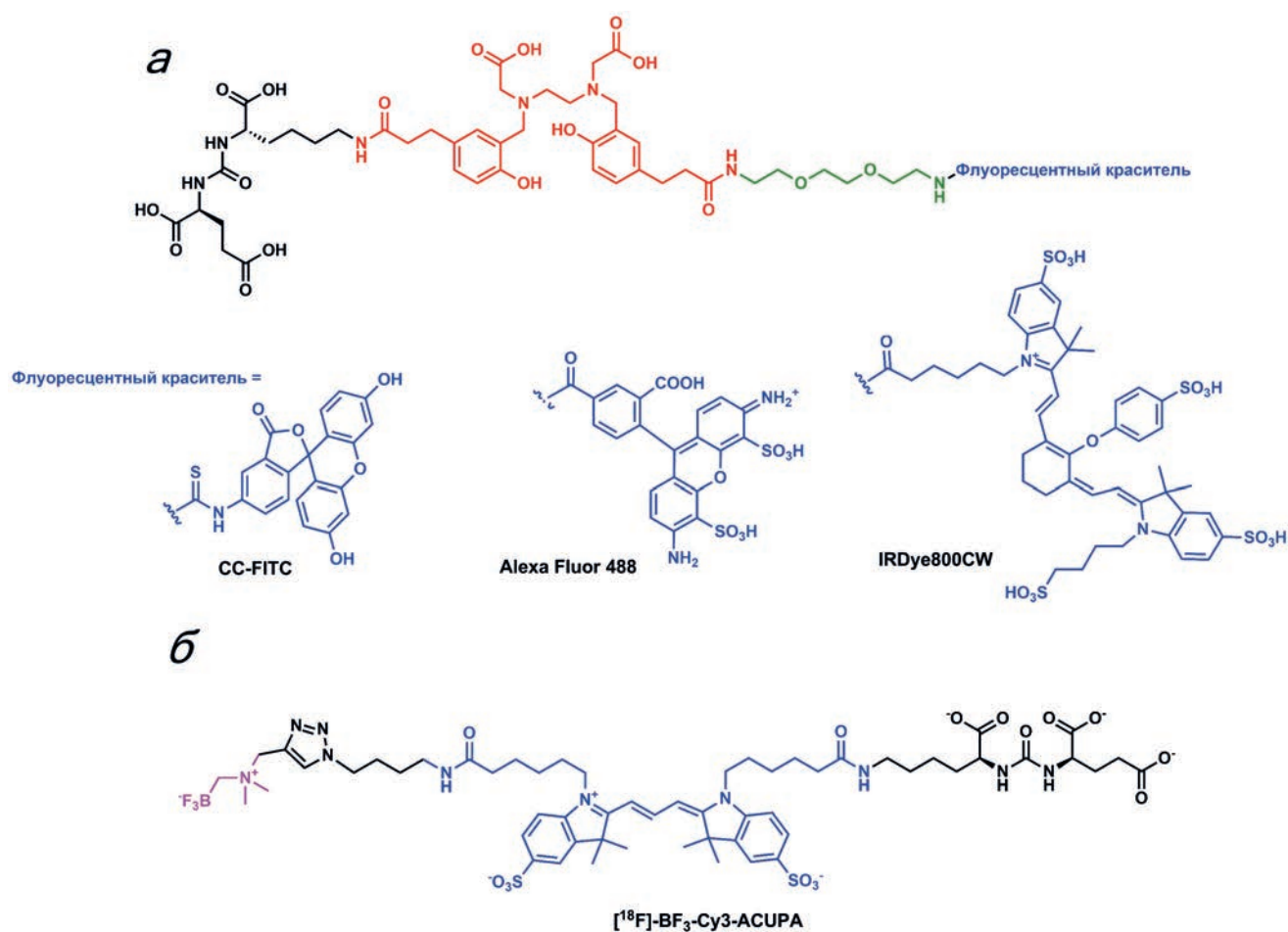


Рис. 8. Структуры последовательных конъюгатов: *а* – лиганд мочевины DCL (чёрный) связан с хелатирующим агентом HBED-CC (красный) и флуоресцентными метками FITC, Alexa Fluor 488, IRDye800CW, DyLight800 (синий); *б* – лиганд мочевины DCL (чёрный) связан с флуоресцентной меткой Cy3 (синий) и фторидной ловушкой (розовый). Линкер выделен зелёным цветом

LS174T-PSMA, в отличие от описанных ранее в литературе для PSMA-617, PSMA-I&T и PSMA-1007 LNCaP. Тем не менее прямое сравнение ксенотрансплантатов LNCaP и LS174T-PSMA не выявило существенных различий в поглощении трассера PSMA-I&T между этими моделями, что убедительно свидетельствует о том, что эффективность лигандов SPAAC находится в том же диапазоне, что и у клинически доступных лигандов.

Разветвлённые конъюгаты представляют собой стерически весьма сложные структуры, что ввиду строения активного центра ПСМА может снизить проникновение таких конъюгатов в клетку. В отличие от лекарственных препаратов, где закрытие той или иной функциональной группы может привести к полной потере противоопухолевой активности, хелатирующие и флуоресцентные агенты переносят модификации по свободным функциональным группам без значительных изменений спектральных свойств. Это открывает возможность для получения «линейных» конъюгатов,

в которых активные вещества последовательно соединены между собой. Опять же стоит отметить, что в данном случае флуоресцентная метка выступает ещё и в роли линкера, который может улучшать степень связывания конъюгата с ПСМА. Однако можно сделать и наоборот: поставить хелатирующий агент в середине конъюгата, при этом он должен быть стерически доступным для белка-мишени.

Примеры таких конъюгатов получены в работе Baranski et al. [35]. Лиганд-вектор в структуре представлен мочевиной DCL, далее в структуру введён хелатирующий агент HBED-CC. Присоединение происходит по карбоксильным группам со стороны ароматических колец. Далее идёт конъюгирование с флуоресцентными красителями различных типов: CC-FITC, Alexa Fluor 488, IRDye800CW (рис. 8, *а*). В качестве лиганда сравнения был взят PSMA-11. Мечение проводили ^{68}Ga , где радиоактивный выход для всех конъюгатов составил 99%.

Все конъюгаты показали сопоставимую аффинность с лигандом сравнения PSMA-11

в диапазоне 19–24 нМ. Это говорит о том, что хелатор HBED-CC не повышает аффинность конъюгата. Учитывая, что при мечении радионуклидом его структура претерпевает изменения и становится более объёмной, то, что аффинность не ухудшается относительно лиганда сравнения, является очень хорошим результатом. Мечение ^{68}Ga принципиально не повлияло на биологическую активность соединений. Селективность *in vitro* проверялась на клеточной линии LNCaP.

Высокое поглощение опухолью наблюдалось и на испытаниях *in vivo*. В сравнении с ранее полученным конъюгатом, более высокое поглощение показывают конъюгаты меченных ^{68}Ga с FITC ($10,86 \pm 0,94\%$ ID/g; фактор: 2,2; $p < 0,05$), IRDye800CW ($13,66 \pm 3,73\%$ ID/g; фактор: 2,8; $p < 0,05$) и DyLight800 ($15,62 \pm 5,52\%$ ID/g; фактор: 3,2; $p < 0,05$) против ^{68}Ga -PSMA-11 ($4,89 \pm 1,34\%$ ID/g). В то же время конъюгаты [^{68}Ga]-Glu-urea-Lys-HBED-CC-Alexa Fluor 488 показал аналогичное поглощение опухолью ($9,12 \pm 5,47\%$ ID/g; фактор: 1,9; $p > 0,05$). Выведение препаратов происходит через почки, также стандартно конъюгаты накапливались в экспрессирующей ПСМА селезёнке мышей. Благодаря своей флуоресценции в ближней инфракрасной области для дальнейшего применения лучше всего подходят [^{68}Ga]-Glu-urea-Lys-HBED-CC-IRDye800CW и [^{68}Ga]-Glu-urea-Lys-HBED-CC-DyLight800. Чуть лучшее соотношение опухоль–орган для соответствующих органов показывает конъюгат с флуоресцентной меткой IRDye800CW ([^{68}Ga]-Glu-urea-Lys-HBED-CC-IRDye800CW).

Исходя из исследования накопления сигнала установлено, что с течением времени наибольшее снижение уровня сигнала происходит через 2 часа после инъекции с дальнейшим сохранением этого уровня до 6 часов, что говорит о стабилизации поглощения конъюгата опухолью.

В другой работе были получены последовательные конъюгаты на основе мочевины DCL с флуоресцентными красителями Cu3 и с «фторидной ловушкой» (рис. 8, б) [36]. Присоединение проводилось через карбоксильные группы флуоресцентной метки Sulfo- Cu3 . Особенностью данной работы является то, что полученный конъюгат смог выйти на клинические испытания на людях [37, 38].

Исследования на клеточных линиях PC3-PIP (ПСМА +) и PC-3 (ПСМА –), проведённые Kommidi et al. [36], показали высокое сродство к простатическому специфическому мембранному антигену методами проточной цитометрии и флуоресцентной микроскопии.

Второй метод подтверждает мембранное накопление конъюгата во внеклеточном домене целевого белка. С помощью проточной цитофлуориметрии установлено сродство полученного конъюгата со значением $\text{EC}_{50} = 6,74 \pm 1,33$ нМ.

Исследования на ксенотрансплантатах мышей PC3-PIP и PC-3 в условиях *ex vivo* с помощью γ -сцинтилляционного счётчика подтвердили относительную селективность в опухолевой ткани и позволили качественно определить накопление в органах и тканях. Помимо этого, накопление и выведение вещества из организма происходит через почки, а также часть вещества остаётся в слюнных железах и проксимальном отделе тонкой кишки, что обусловлено наличием в их тканях ПСМА. Однако, несмотря на то что NAALADase I присутствует и в мозге, присутствия конъюгата там не обнаружено, что говорит о том, что соединение не способно проходить через гематоэнцефалический барьер. ПЭТ-детектирование флуоресценции также доказывает накопление сигнала в ПСМА-экспрессирующей клеточной линии PC3-PIP. Сигнал здесь в 5,2 раза выше, чем в ксенотрансплантате PC-3 (на предварительно вырезанной ткани). Устойчивое окрашивание наблюдается даже спустя 24 часа после инъекции.

Клинические испытания на людях проводились на группе мужчин 66 ± 7 лет. Введение препарата не вызывало побочных реакций со стороны нервной, пищеварительной, дыхательной и других систем. Селективное накопление в клетках РПЖ было продемонстрировано на разнообразной группе пациентов, включая пациентов с метастазами, различным уровнем ПСА в крови, различным баллом по шкале Глисона. [^{18}F]- BF_3 - Cu3 -ACUPA показал высокую чувствительность к тканям (ПСМА +) и позволил визуализировать как диссеминированный, так и локализованный рак. Отдельно стоит отметить сохранение флуоресцентного сигнала в течение 24 часов после инъекции, что является большим преимуществом [^{18}F]- BF_3 - Cu3 -ACUPA как диагностического агента. Благодаря этому пациент может прийти на ПЭТ-визуализацию, после чего без дополнительных инъекций получить возможность проведения интраоперационной флуоресцентной диагностики. Так как период полураспада ^{18}F составляет 108 минут, то к моменту операции уже не будет происходить ионизирующего излучения, а не связанный конъюгат выведется из крови и мочи.

Также стоит обратить внимание на работу Derks et al. [39], в которой представлены

двойные конъюгаты на основе мочевины, содержащие хелатор DOTA и сенсibilизатор IRDye700DX, о котором стоит сказать несколько слов. Данное соединение может выступать как в качестве флуоресцентной метки, так и в качестве фотосенсibilизатора. Фотодинамическая терапия предполагает селективное накопление сенсibilизатора в опухолевой ткани, после чего происходит его возбуждение пучком лазера, приближенного к максимальной длине поглощения красителя. Благодаря фотохимическим процессам происходит образование активных форм кислорода, вызывающих гибель клеток. Таким образом, несмотря на то что конъюгат является бимодальным, он при этом обладает тройным назначением. Хелатирование DOTAG в данной работе производилось ^{111}In и показало эффективную радиодиагностику. IRDye700DX, являясь фотосенсibilизатором, также обладает и спектральными характеристиками. Таким образом, конъюгаты могут выполнять как диагностическую, так и терапевтическую роль. Данная работа является продолжением более ранних работ научной группы Derks. Изначально ими была получена библиотека конъюгатов, где векторная молекула представляла собой мочевины DCL с присоединённым фрагментом аминокислотной кислоты в качестве линкера. Далее производилось варьирование структуры линкера различными полипептидными фрагментами. В результате авторы статьи отмечают, что наилучшие результаты аффинности показывает конъюгат с пептидной последовательностью D-Phe-Glu-Glu, что хорошо согласуется с вышеприведённым нами аргументом о том, что аффинность конъюгатов может быть улучшена путём введения в структуру ароматических фрагментов и/или аминокислот, содержащих отрицательно заряженные группы. В следующей работе за основу были взяты уже зарекомендовавшие себя в исследованиях мочевины PSMA-1007 и PSMA-617. Также здесь можно проследить развитие модификации линкеров, которое подробно обсуждалось в нашем предыдущем обзоре [40].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Итак, на сегодняшний день флуоресцентные конъюгаты, направленные на простатический специфический мембранный антиген, представляют большой потенциал в области гистологических исследований и интраоперационной хирургии, а также в области фотодинамической терапии. Большое количество

исследований проведено с использованием «стандартных» флуоресцентных красителей: карбоцианинов, флуоресцеинов и др. На наш взгляд, стоит обратить внимание на достижения последних лет в области флуоресцентных молекул, меняющих свои физико-химические свойства в зависимости от окружающих их условий: молекулярные ротаторы, позволяющие значительно увеличить уровень сигнал/шум при визуализации; УФ-чувствительные метки, которые можно применять как индивидуально, так и в сочетании со стандартными флуоресцентными метками и хелатирующими агентами; фотосенсibilизаторы, некоторые из которых, как было описано выше, можно применять как в диагностических, так и в терапевтических целях.

Современные синтетические возможности позволяют эффективно оптимизировать время синтеза, затраты на реактивы и очистку соединений и др. Развитие твердофазных методов синтеза позволило значительно ускорить варьирование структур лигандов и установить основные закономерности в соотношении структура–активность. Благодаря этому установлено, что оптимальными векторными молекулами являются модифицированные мочевины на основе глутамата и лизина. Целесообразно между векторной молекулой и флуоресцентной меткой вводить отрицательно заряженные функциональные группы (лизин, глутаминовая кислота и др.) и ароматические системы (фрагменты фенилаланина, тирозина и др.). Стоит учитывать, что, если молекула флуорофора достаточно небольшая и имеет, например, достаточное количество сульфогрупп, она также может взаимодействовать с воронкообразным туннелем ПСМА и тем самым повышать сродство конъюгата. Также при выборе флуоресцентного красителя следует обращать внимание на такие параметры, как квантовый выход, водорастворимость, длины волн поглощения и испускания (для того чтобы попасть в окно прозрачности биологических тканей).

Возможно, в дальнейшем будут разработаны флуоресцентные камеры достаточной мощности, которые позволят визуализировать красители в тканях человека. Тогда мы сможем сократить облучение пациентов при использовании радиофармпрепаратов и применять его только в случае лечения. Причём, создавать терапевтические конъюгаты будет возможно на базе высокоселективных диагностических конъюгатов путём замены активного вещества. При создании новых молекул в первую очередь стоит ориентироваться на цель, которую закладывают в её разработку. Если целью

является получение гистологического препарата, то имеет смысл разрабатывать моноконъюгаты малых размеров, так как это сократит синтетическую схему и ускорит наработку таких веществ. Если речь о препарате для пациентов, то разработка многофункциональных соединений становится приоритетной, так как позволит снизить количество введений и дозировку. Таким образом, химиотерапия для диагностики (контрастные реагенты) становится более эффективной и безопасной.

Вклад авторов. Успенская А.А. — концепция, написание работы: оригинальный текст; Красников П.А. — оформление работы; Ма-

жуга А.Г. — руководство работой; Белоглазкина Е.К. — написание работы: рецензирование; Мачулкин А.Э. — концепция, написание работы: редактирование.

Финансирование. Исследование выполнено за счёт гранта Российского научного фонда № 23-23-00297, <https://rscf.ru/project/23-23-00297/>.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов в финансовой или какой-либо иной сфере.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Jones, A. D., and Wilton, J. C. (2017) Can intra-operative fluorescence play a significant role in hepatobiliary surgery? *Eur. J. Surg. Oncol.*, **43**, 1622-1627, doi: 10.1016/j.ejso.2017.02.015.
2. Fei, X., and Gu, Y. (2009) Progress in modifications and applications of fluorescent dye probe, *Prog. Nat. Sci.*, **19**, 1-7, doi: 10.1016/j.pnsc.2008.06.004.
3. Hemmer, E., Benayas, A., Légaré, F., and Vetrone, F. (2016) Exploiting the biological windows: current perspectives on fluorescent bioprobes emitting above 1000 nm, *Nanoscale Horizons*, **1**, 168-184, doi: 10.1039/c5nh00073d.
4. Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., and Laversanne, M. (2021) Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries, *CA Cancer J. Clin.*, **71**, 209-249, doi: 10.3322/caac.21660.
5. Jackson, P. F., Cole, D. C., Slusher, B. S., Stetz, S. L., Ross, L. E., Donzanti, B. F., and Trainor, D. A. (1996) Design, synthesis, and biological activity of a potent inhibitor of the neuropeptidase N-acetylated α -linked acidic dipeptidase, *J. Med. Chem.*, **39**, 619-622, doi: 10.1021/jm950801q.
6. Kozela, E., Wrobel, M., Kos, T., Wojcikowski, J., Daniel, W. A., Wozniak, K. M., Slusher, B. S., and Popik, P. (2005) 2-MPPA, a selective glutamate carboxypeptidase II inhibitor, attenuates morphine tolerance but not dependence in C57/Bl mice, *Psychopharmacology (Berl)*, **183**, 275-284, doi: 10.1007/s00213-005-0182-5.
7. Zhang, A. X., Murelli, R. P., Barinka, C., Michel, J., Cocleaza, A., Jorgensen, W. L., Lubkowski, J., and Spiegel, D. A. (2010) A remote arene-binding site on prostate specific membrane antigen revealed by antibody-recruiting small molecules, *J. Am. Chem. Soc.*, **132**, 12711-12716, doi: 10.1021/ja104591m.
8. Barinka, C., Novakova, Z., Hin, N., Bíme, D., Ferraris, D. V., Duvall, B., Kabarriti, G., Tsukamoto, R., Budesinsky, M., Motlova, L., Rojas, C., Slusher, B. S., Rokob, T. A., Rulíšek, L., and Tsukamoto, T. (2019) Structural and computational basis for potent inhibition of glutamate carboxypeptidase II by carbamate-based inhibitors, *Bioorg. Med. Chem.*, **27**, 255-264, doi: 10.1016/j.bmc.2018.11.022.
9. Barinka, C., Rojas, C., Slusher, B., and Pomper, M. (2012) Glutamate carboxypeptidase II in diagnosis and treatment of neurologic disorders and prostate cancer, *Curr. Med. Chem.*, **19**, 856-870, doi: 10.2174/092986712799034888.
10. Cilibrizzi, A., Wang, J. T.-W., Memdouh, S., Iacovone, A., McElroy, K., Jaffar, N., Young, J. D., Hider, R. C., Blower, P., Al-Jamal, K., and Abbate, V. (2022) PSMA-targeted NIR probes for image-guided detection of prostate cancer, *Colloids Surf. B Biointerfaces*, **218**, 112734, doi: 10.1016/j.colsurf.2022.112734.
11. Petrov, S. A., Machulkin, A. E., Uspenskaya, A. A., Zyk, N. Y., Nimenko, E. A., Garanina, A. S., Petrov, R. A., Polshakov, V. I., Grishin, Y. K., Roznyatovsky, V. A., Zyk, N. V., Majouga, A. G., and Beloglazkina, E. K. (2020) Polypeptide-based molecular platform and its docetaxel/sulfo-Cy5-containing conjugate for targeted delivery to prostate specific membrane antigen, *Molecules*, **25**, 5784, doi: 10.3390/molecules25245784.
12. Liu, T., Jabbes, M., Nedrow-Byers, J. R., Wu, L. Y., Bryan, J. N., and Berkman, C. E. (2011) Detection of prostate-specific membrane antigen on HUVECs in response to breast tumor-conditioned medium, *Int. J. Oncol.*, **38**, 1349-1355, doi: 10.3892/ijo.2011.946.
13. Humblet, V., Lapidus, R., Williams, L. R., Tsukamoto, T., Rojas, C., Majer, P., Hin, B., Ohnishi, S., De Grand, A. M., Zaheer, A., Renze, J. T., Nakayama, A., Slusher, B. S., and Frangioni, J. V. (2005) High-affinity near-infrared fluorescent

- small-molecule contrast agents for *in vivo* imaging of prostate-specific membrane antigen, *Mol. Imaging*, **4**, 448-462, doi: 10.2310/7290.2005.05163.
14. Jing, Y., Cai, M., Zhou, L., Jiang, J., Gao, J., and Wang, H. (2020) Application of an inhibitor-based probe to reveal the distribution of membrane PSMA in dSTORM imaging, *Chem. Commun.*, **56**, 13241-13244, doi: 10.1039/D0CC04889E.
 15. Matsuoka, D., Watanabe, H., Shimizu, Y., Kimura, H., Ono, M., and Saji, H. (2021) Synthesis and evaluation of a novel near-infrared fluorescent probe based on succinimidyl-Cys-C(O)-Glu that targets prostate-specific membrane antigen for optical imaging, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **27**, 4876-4880, doi: 10.1016/j.bmcl.2017.09.037.
 16. Ye, S., Zhang, H., Fei, J., Wolstenholme, C. H., and Zhang, X. (2021) A general strategy to control viscosity sensitivity of molecular rotor-based fluorophores, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **60**, 1339-1346, doi: 10.1002/anie.202011108.
 17. Karimi, A., Börner, R., Mata, G., and Luedtke, N. W. (2020) A highly fluorescent nucleobase molecular rotor, *J. Am. Chem. Soc.*, **142**, 14422-14426, doi: 10.1021/jacs.0c05180.
 18. Kopka, K., Benešová, M., Bařinka, C., Haberkorn, U., and Babich, J. (2017) Glu-ureido-based inhibitors of prostate-specific membrane antigen: Lessons learned during the development of a novel class of low-molecular-weight theranostic radiotracers, *J. Nucl. Med.*, **58**, 17S-26S, doi: 10.2967/jnumed.116.186775.
 19. Zhang, J., Rakhimbekova, A., Duan, X., Yin, Q., Foss, C. A., Fan, Y., Xu, Y., Li, X., Cai, X., Kutil, Z., Wang, P., Yang, Z., Zhang, N., Pomper, M. G., Wang, Y., Bařinka, C., and Yang, X. (2021) A prostate-specific membrane antigen activated molecular rotor for real-time fluorescence imaging, *Nat Commun.*, **12**, 5460, doi: 10.1038/s41467-021-25746-6.
 20. Lincoln, R., Bossi, M. L., Remmel, M., D'Este, E., Butkevich, A. N., and Hell, S. W. (2022) A general design of caging-group-free photoactivatable fluorophores for live-cell nanoscopy, *Nat. Chem.*, **14**, 1013-1020, doi: 10.1038/s41557-022-00995-0.
 21. Chen, Y., Dhara, S., Banerjee, S. R., Byun, Y., Pullambhatla, M., Mease, R. C., and Pomper, M. G. (2009) A low molecular weight PSMA-based fluorescent imaging agent for cancer, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **390**, 624-629, doi: 10.1016/j.bbrc.2009.10.017.
 22. Wang, X., Huang, S. S., Heston, W. D. W., Guo, H., Wang, B. C., and Basilion, J. P. (2014) Development of targeted near-infrared imaging agents for prostate cancer, *Mol. Cancer Ther.*, **13**, 2595-2606, doi: 10.1158/1535-7163.MCT-14-0422.
 23. Huang, S. S., Wang, X., Zhang, Y., Doke, A., Difilippo, F. P., and Heston, W. D. (2014) Improving the biodistribution of PSMA-targeting tracers with a highly negatively charged linker, *Prostate*, **74**, 702-713, doi: 10.1002/pros.22789.
 24. Tang, W., and Becker, M. L. (2014) "Click" reactions: a versatile toolbox for the synthesis of peptide-conjugates, *Chem. Soc. Rev.*, **43**, 7013-7039, doi: 10.1039/c4cs00139g.
 25. Ciuk, A. K., and Lindhorst, T. K. (2015) Synthesis of carbohydrate-scaffolded thymine glycoconjugates to organize multivalency, *Beilstein J. Org. Chem.*, **11**, 668-674, doi: 10.3762/bjoc.11.75.
 26. Machulkin, A. E., Uspenskaya, A. A., Ber, A. P., Petrov, S. A., Saltykova, I. V., Ivanenkov, Y. A., Skvortsov, D. A., Erofeev, A. S., Gorelkin, P. V., Beloglazkina, E. K., Belov, E. Iu., Khazanova, E. S., and Majouga, A. G. (2019) Peptide agent comprising a urea derivative based PSMA-binding ligand, a method for preparing the same, and use for producing a conjugate with a drug and diagnostic agent, RF Patent 2697519.
 27. Machulkin, A. E., Shafikov, R. R., Uspenskaya, A. A., Petrov, S. A., Ber, A. P., Skvortsov, D. A., Nimenko, E. A., Zyk, N. U., Smirnova, G. B., Pokrovsky, V. S., Abakumov, M. A., Saltykova, I. V., Akhmirov, R. T., Garanina, A. S., Polshakov, V. I., Saveliev, O. Y., Ivanenkov, Y. A., Aladinskaya, A. V., Finko, A. V., Yamansarov, E. U., Krasnovskaya, O. O., Erofeev, A. S., Gorelkin, P. V., Dontsova, O. A., Beloglazkina, E. K., Zyk, N. V., Khazanova, E. S., and Majouga, A. G. (2021) Synthesis and biological evaluation of PSMA ligands with aromatic residues and fluorescent conjugates based on them, *J. Med. Chem.*, **64**, 4532-4552, doi: 10.1021/acs.jmedchem.0c01935.
 28. Weissleder, R. (2001) A clearer vision for *in vivo* imaging: progress continues in the development of smaller, more penetrable probes for biological imaging, *Nat. Biotechnol.*, **19**, 316-317, doi: 10.1038/86684.
 29. Kularatne, S. A., Thomas, M., Myers, C. H., Pravin, G., Kanduluru, A. K., Crian, C. J., and Cichocki, B. N. (2019) Evaluation of novel prostate-specific membrane antigen-targeted near-infrared imaging agent for fluorescence-guided surgery of prostate cancer, *Clin. Cancer Res.*, **25**, 177-187, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-18-0803.
 30. Kelderhouse, L. E., Chelvam, V., Wayua, C., Mahalingam, S., Poh, S., Kularatne, S. A., and Low, P. S. (2013) Development of tumor-targeted near infrared probes for fluorescence guided surgery, *Bioconjug. Chem.*, **24**, 1075-1080, doi: 10.1021/bc400131a.
 31. Raveenthiran, S., Esler, R., Yaxley, J., and Kyle, S. (2019) The use of ⁶⁸Ga-PET/CT PSMA in the staging of primary and suspected recurrent renal cell carcinoma, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, **46**, 2280-2288, doi: 10.1007/s00259-019-04432-2.
 32. Salas Fragomeni, R. A., Amir, T., Sheikhabaei, S., Harvey, S. C., Javadi, M. S., Solnes, M. B., Kiess, A. P., Allaf, M. E., Pomper, M. G., Gorin, M. A., and Rowe, S. P. (2018) Imaging of nonprostate cancers using PSMA-targeted radiotracers: rationale, current

- state of the field, and a call to arms, *J. Nucl. Med.*, **59**, 871-877, doi: 10.2967/jnumed.117.203570.
33. Kellogg, R. E., and Bennett, R. G. (1964) Radiationless intermolecular energy transfer. III. Determination of phosphorescence efficiencies, *J. Chem. Phys.*, **41**, 3042-3045, doi: 10.1063/1.1725672.
 34. Derks, Y. H. W., Rijpkema, M., Amadajais-Groenen, H. I. V., Loeff, C. C., Roode, K. E., Kip, A., Laverman, P., Lütke, S., Heskamp, S., and Löwik, D. W. P. M. (2022) Strain-promoted azide-alkyne cycloaddition-based PSMA-targeting ligands for multimodal intraoperative tumor detection of prostate cancer, *Bioconjug. Chem.*, **33**, 194-205, doi: 10.1021/acs.bioconjchem.1c00537.
 35. Baranski, A. C., Schäfer, M., Bauder-Wüst, U., Roscher, M., Schmidt, J., Stenau, E., Simpfendorfer, T., Teber, D., Maier-Hein, L., Hadaschik, B., Haberkorn, U., Eder, M., and Kopka, K. (2018) PSMA-11-derived dual-labeled PSMA inhibitors for preoperative PET imaging and precise fluorescence-guided surgery of prostate cancer, *J. Nucl. Med.*, **59**, 639-645, doi: 10.2967/jnumed.117.201293.
 36. Kommidi, H., Guo, H., Nurili, F., Vedvyas, Y., Jin, M. M., McClure, T. D., Ehdaie, B., Sayman, H. B., Akin, O., Aras, O., and Ting, R. (2018) ¹⁸F-Positron emitting/trimethine cyanine-fluorescent contrast for image-guided prostate cancer management, *J. Med. Chem.*, **61**, 4256-4262, doi: 10.1021/acs.jmedchem.8b00240.
 37. Aras, O., Demirdag, C., Kommidi, H., Guo, H., Pavlova, I., Aygun, A., Karayel, E., Pehlivanoglu, H., Yeyin, N., Kyprianou, N., Chen, N., Harmsen, S., Sonmezoglu, K., London, D. J., Oklu, R., Ting, R., Tewari, A., Akin, O., and Sayman, H. B. (2021) Small molecule, multimodal, [¹⁸F]-PET and fluorescence imaging agent targeting prostate-specific membrane antigen: first-in-human study, *Clin. Genitourin. Cancer*, **19**, 405-416, doi: 10.1016/j.clgc.2021.03.011.
 38. Aras, O., Demirdag, C., Kommidi, H., Pavlova, I., Boyko, V., London, D. J., Ting, R., Tewari, A., Akin, O., and Sayman, H. B. (2021) Simultaneous injection of ¹⁸F-BF₃-Cy3-ACUPA and non-radioactive Cy7-ACUPA probes: a promising pre-biopsy PET and *ex vivo* fluorescence imaging approach to evaluate prostate cancer, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, **48**, 3732-3733, doi: 10.1007/s00259-021-05344-w.
 39. Derks, Y. H. W., van Lith, S. A. M., Amadajais-Groenen, H. I. V., Wouters, L. W. M., Kip, A., Franssen, G. M., Laverman, P., Löwik, D. W. P. M., Heskamp, S., and Rijpkema, M. (2022) Theranostic PSMA ligands with optimized backbones for intraoperative multimodal imaging and photodynamic therapy of prostate cancer, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, **49**, 2425-2435, doi: 10.1007/s00259-022-05685-0.
 40. Uspenskaya, A. A., Nimenko, E. A., Machulkin, A. E., Beloglazkina, E. K., and Majouga, A. G. (2021) The importance of linkers in the structure of PSMA ligands, *Curr. Med. Chem.*, **28**, 1-31, doi: 10.2174/0929867328666210804092200.

FLUORESCENT CONJUGATES BASED ON PROSTATIC SPECIFIC MEMBRANE ANTIGEN LIGANDS AS AN EFFECTIVE VISUALIZATION TOOL FOR PROSTATE CANCER

Review

A. A. Uspenskaia^{1*}, P. A. Krasnikov¹, A. G. Majouga^{1,2,3}, E. K. Beloglazkina¹, and A. E. Machulkin^{1,4}

¹ Faculty of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia ; e-mail: uspenskaya.n@gmail.com

² National University of Science and Technology "MISiS", 119049 Moscow, Russia

³ Dmitry Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, 125047 Moscow, Russia

⁴ RUDN University, 117198 Moscow, Russia

Fluorescent dyes are widely used in histological studies and in intraoperative surgery, including against prostate cancer (PC), which is one of the most common types of cancerous tumors among men today. Targeted delivery of fluorescent conjugates greatly improves diagnostic efficiency and allows for timely correct diagnosis. In the case of PC, the protein marker is prostate specific membrane antigen (PSMA). To date, a large number of diagnostic conjugates targeting PSMA have been created based on modified urea. The review focuses on narrowly targeted conjugates selectively binding to PSMA and answers the following questions. Which fluorescent dyes are already in use in the field of PC diagnosis? What factors influence the structure-activity ratio of the final molecule? What should be considered when selecting a fluorescent tag to create new diagnostic conjugates? And what can be offered in this field to date?

Keywords: prostate cancer, fluorescent dyes, prostate-specific membrane antigen, PSMA, targeted drug delivery

УДК 615.28

ГИСТОНОВЫЕ МЕТИЛТРАНСФЕРАЗЫ КАК НОВАЯ МИШЕНЬ ЭПИГЕНЕТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ВОРИНОСТАТА

© 2023 В.П. Максимова^{1#}, Ю.В. Макусь^{1,2#}, В.Г. Попова^{1,3}, А.Ю. Прус^{1,4},
О.Г. Усалка^{1,5}, Е.С. Трапезникова⁵, Е.М. Жидкова¹, Г.А. Белицкий¹,
М.Г. Якубовская¹, К.И. Кирсанов^{1,2*}

¹ ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России,
115478 Москва, Россия; электронная почта: kkirsanov85@yandex.ru

² ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», 117198 Москва, Россия

³ ФГБОУ ВО «Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева»,
125047 Москва, Россия

⁴ ФГБОУ ВО «МИРЭА – Российский технологический университет», 119571 Москва, Россия

⁵ ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России, 119991 Москва, Россия

Поступила в редакцию 02.02.2023

После доработки 13.04.2023

Принята к публикации 20.04.2023

Характерными изменениями в системе эпигенетической регуляции экспрессии генов, сопровождающими процесс злокачественной трансформации клетки, являются aberrантное метилирование и ацетилирование гистонов. Активно используемым в клинической онкологической практике эпигенетически активным препаратом является вориностат, противоопухолевый эффект которого, как правило, связывают с ингибированием гистоновых деацетилаз. Эффекты этого препарата на метилирование гистонов изучены недостаточно. Используя тест-систему HeLa T1, позволяющую оценить интегральный эффект эпигенетически активных соединений по активации экспрессии репортерного гена *GFP*, и нокдаун генов интерферирующими РНК, мы показали, что ингибирующее действие вориностата направлено не только на HDAC1, но и на SUV39H1, SUV39H2, SUV420H1, EZH2. С помощью Вестерн-блоттинга была подтверждена способность вориностата подавлять экспрессию ферментов SUV39H1/2, SUV420H1, EZH2 и, кроме того, было впервые выявлено его ингибирующее действие на экспрессию ферментов SUV420H2 и DOT1L. Полученные данные расширяют представление об эпигенетических эффектах вориностата и демонстрируют необходимость масштабного анализа его активности в отношении других эпигенетических ферментов. Детальное понимание механизма эпигенетического действия вориностата будет способствовать его более адекватному использованию в терапии опухолей с aberrантным эпигенетическим профилем.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: ЗНО с aberrантным эпигенетическим профилем, вориностат, SAHA, метилирование гистонов, гистоновые метилтрансферазы (HMT), тест-система HeLa T1, SUV39H1, SUV39H2, EZH2, SUV420H1, SUV420H2, DOT1L.

DOI: 10.31857/S0320972523070096, **EDN:** FXUMTH

ВВЕДЕНИЕ

Необратимый процесс опухолевой трансформации клеток обусловлен генетическими повреждениями ДНК, приводящими к точечным

мутациям генов, амплификации генов и хромосомным транслокациям. При этом опухолевая трансформация сопровождается обширным перепрограммированием транскриптома, которое происходит за счет изменения паттерна

Принятые сокращения: Б/т – нетрансфицированные клетки; ЗНО – злокачественные новообразования; 5-aza – 5-азацидин; CBL0137 – кураксин CBL0137; DNMT – ДНК-метилтрансферазы; G9a, GLP, SUV39H1, SUV39H2 – гистоновые метилтрансферазы класса KMT1; DOT1L – гистоновая метилтрансфераза класса KMT4; EZH2 – гистоновая метилтрансфераза класса KMT6; HDAC – гистоновые деацетилазы; HeLa T1 – популяция клеток HeLa Трихостатин А-Индуктируемая; HMT – гистоновые метилтрансферазы; KMT – лизиновые метилтрансферазы; me – метильная группа; SAHA – вориностат (субериланилид гидроксамовой кислоты); SUV420H1, SUV420H2 – гистоновые метилтрансферазы класса KMT5; TSA – трихостатин А.

* Адресат для корреспонденции.

Авторы внесли равный вклад в работу.

эпигенетических модификаций, в том числе метилирования гистонов [1]. Метилирование гистонов является одним из ключевых эпигенетических механизмов регуляции транскрипции и играет важную роль в таких процессах, как репликация ДНК, репарация и рекомбинация ДНК, транскрипция генов, развитие клеточного цикла и пространственная организация хромосом [2–4]. В основном метильные (me) модификации располагаются на аминокислотных остатках лизина и аргинина *N*-концевых хвостов гистонов H3 и H4 и подразделяются на метки, активирующие транскрипцию (H3K4me2/3, H3K36me2/3, H3K79me1/2/3) [3, 5, 6] и ответственные за подавление экспрессии генов (H3K9me2/3, H4K20me3, H3K27me3) [7–9]. Сочетание различных гистоновых модификаций играет ключевую роль для образования эухроматина и гетерохроматина [10]. Процесс катализа метилирования и деметилирования гистонов осуществляют ферменты антагонисты – гистоновые метилтрансферазы (HMT) и деметилазы, которые функционируют в сложных белковых комплексах, состоящих из различных хроматин-модифицирующих ферментов, транскрипционных факторов или белков-репрессоров транскрипции [11, 12]. Формирование аберрантного профиля метилирования гистонов является результатом структурных нарушений в генах метилтрансфераз и деметилаз, а также результатом некорректной экспрессии данных ферментов в результате внешних воздействий и/или опосредованного влияния генетических нарушений, вызвавших необратимую трансформацию клетки [13]. Гиперэкспрессия и мутации HMT наблюдаются при различных типах злокачественных новообразований (ЗНО), поскольку изменения в структуре хроматина могут влиять на сигнальные пути и паттерны экспрессии генов, которые способствуют онкогенезу [14].

Наиболее часто вовлеченными в процесс канцерогенеза являются метилтрансферазы EZH1/2, SETDB1, SUV39H1, SUV420H1/2, G9a, GLP, DOT1L, PRMT5, PRMT6, сверхэкспрессия которых наблюдается и часто коррелирует с худшим прогнозом при таких ЗНО, как рак молочной железы, рак предстательной железы, рак яичников, легких, шейки матки, кожи и др. [9, 15–28]. Таким образом, данные ферменты являются перспективными мишенями для противоопухолевой терапии. В настоящее время идет активный поиск и исследование низкомолекулярных соединений, способных модулировать активность HMT. Ряд модуляторов, таких как Chaetocin (ингибитор

SUV39H1/H2), UNC0642 и BIX01294 (ингибиторы G9a/GLP), находятся на стадии доклинических испытаний [29–32]. В свою очередь, агенты Pinometostat (ингибитор DOT1L), SHR2554 (ингибитор EZH2), PRT543 (ингибитор PRMT5) и EZM8266 (ингибитор G9a) проходят клинические испытания для терапии пациентов с опухолями кроветворной системы, а также солидными ЗНО [33–35]. В 2020 г. для противоопухолевой терапии был одобрен первый ингибитор HMT – таземетостат, действие которого направлено на подавление ферментативной активности EZH2 [36].

Вориностат, также известный как SANA или Золинза®, является ингибитором гистоновых деацетилаз (HDAC) классов I, II и IV [37]. Данный препарат применяется для лечения пациентов с прогрессирующей, рецидивирующей или устойчивой к химиотерапии кожной Т-клеточной лимфомой [38]. Механизм действия вориностата заключается в связывании иона цинка, находящегося в активном центре HDAC, в результате чего происходит ингибирование каталитической активности фермента. Следствием ингибирования HDAC является повышение ацетилирования гистонов и активация транскрипции [37]. В результате действия вориностата возрастает ацетилирование не только гистоновых белков, но и ряда негистоновых факторов транскрипции, а также белков, участвующих в регуляции клеточной пролиферации, миграции и гибели клетки [39]. Обширные исследования *in vitro* и *in vivo* на различных моделях опухолей демонстрируют сильные противоопухолевые эффекты вориностата, включая индукцию ареста клеточного цикла, апоптоза и аутофагии, в том числе в клетках с развившейся химиорезистентностью [40]. В настоящее время накоплен ряд данных клинических испытаний (фазы I и II) о положительном эффекте вориностата в комбинированной терапии таких заболеваний, как множественная миелома, колоректальная карцинома, саркома, миелодиспластический синдром, нейробластома [41–45].

Данные опубликованных исследований свидетельствуют о том, что ингибирование HDAC не является единственным механизмом действия вориностата на систему эпигенетической регуляции транскрипции. Было показано, что ингибиторы HDAC, в том числе вориностат, способствуют увеличению степени метилирования гистона 3 по лизину 4 (H3K4me1/2/3) за счет miRNA-опосредованного подавления экспрессии лизиновых деметилаз семейства JARID1 – RBP2, PLU-1, SMCX и LSD1, относящейся к семейству KDM1 [46]. Также про-

демонстрирована способность вориностата ингибировать экспрессию ДНК-метилтрансфераз DNMT1 и DNMT3b как на уровне мРНК, так и на уровне белка [47]. Кроме того, в нескольких исследованиях было показано, что вориностат вызывает небольшое, но статистически значимое снижение уровня модификаций H3K9me3 и H3K9me2 [46, 47]. Также было продемонстрировано локус-специфическое влияние вориностата на гистоновые метилтрансферазы SUV39H1 и EZH2 [48, 49]. Несмотря на это, детального изучения интегрального влияния вориностата на метилирование гистонов и на опосредующие его НМТ не проводили.

Представленное исследование было направлено на анализ влияния вориностата на процесс метилирования гистонов на интегральном уровне. В качестве модельной системы в работе была использована популяция клеток HeLa T1, несущих в своем геноме эпигенетически репрессированный репортерный ген *GFP*, кодирующий зеленый флуоресцентный белок. Активация экспрессии *GFP* происходит при запуске 15 различных эпигенетических факторов снятия репрессии генов, в том числе генов белков, регулирующих ацетилирование и метилирование гистонов [50]. Нокдаун генов определенных эпигенетических ферментов в клетках HeLa T1 позволяет оценить вклад кодируемых ими белков в эпигенетическую регуляцию транскрипции. В качестве альтернативного подхода, позволяющего провести более широкое исследование в связи с меньшей трудоемкостью и затратностью, для анализа эффектов эпигенетических препаратов использовали определение содержания ферментов с помощью Вестерн-блоттинга. Конкретные задачи работы включали: (1) провести моделирование эффектов ингибиторов с различным действием на гистоновые деацетилазы при нокдауне гена *HDAC1* в тест-системе HeLa T1 для дальнейшего определения характера эпигенетического действия вориностата; (2) провести анализ изменений экспрессии репортерного гена *GFP* при действии вориностата на клетках HeLa T1 с нокдауном генов *HDAC1*, *EZH2*, *SUV39H1*, *SUV39H2* и *SUV420H1*; (3) оценить эффекты вориностата на экспрессию гистоновых метилтрансфераз *EZH2*, *SUV39H1*, *SUV39H2*, *SUV420H1*, *SUV420H2*, *G9a*, *GLP*, *DOT1L*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культивирование клеток. В исследовании использовали клетки HeLa T1 — популяцию

клеток HeLa, содержащих эпигенетически репрессированный вектор на основе вируса саркомы птиц, кодирующий репортерный ген *GFP*. Популяция HeLa T1 была получена в 2008 г. лабораторией А.М. Скалка (Anna Marie Skalka) и Р. Катца (Richard Katz) из Онкологического центра Фокса Чейза (Fox Chase Cancer Center, Филадельфия, США) [50]. В 2011 г. в рамках выполнения общего проекта клеточная популяция HeLa T1 была предоставлена в распоряжение отдела химического канцерогенеза НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина. В 2021 г. в нашей лаборатории была завершена верификация возможности использования клеток HeLa T1 в качестве тест-системы для анализа эпигенетической активности ксенобиотиков [51].

Клетки культивировали во флаконах T-75 («Eppendorf», Германия) в среде Игла, модифицированной Дульбекко (DMEM), содержащей 4,5 г/литр глюкозы («ПанЭко», Россия), 10% (v/v) термически инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки (FBS; «Biosera», Франция), смесь антибиотиков пенициллина (50 ед./мл) и стрептомицина (50 мкг/мл) («ПанЭко») и 2 мМ L-глутамина («ПанЭко»). Культивирование проводили в стандартных условиях (37 °C, 5% CO₂).

Анализ характера эпигенетического действия вориностата в тест-системе HeLa T1. Анализ реактивации эпигенетически репрессированного гена *GFP* при совместном действии нокдауна гена *HDAC1* и эпигенетических модуляторов трихостатина А, 5-азацитидина и кураксина CBL0137 в тест-системе HeLa T1. Трихостатин А (TSA; «Selleckchem», США), 5-азацитидин (5-aza; «Merck», Германия) и кураксин CBL0137 (CBL0137; «Инкурон», Россия) растворяли в 100%-ном диметилсульфоксиде (ДМСО, «ПанЭко»), стоковая концентрация растворов составила 10 мМ. Клетки HeLa T1 высевали в 24-луночный планшет («Eppendorf») по 20 000 клеток в лунку и через 10 ч проводили трансфекцию 5 нМ siRNA (малые интерферирующие РНК) к мРНК гена *HDAC1* (GS3065). Для нокдауна использовали набор из 4 siRNA («Qiagen», Германия). Трансфекцию осуществляли с помощью реактива HiPerFect Transfection Reagent («Qiagen») по протоколу производителя. Концентрации siRNA были выбраны по рекомендации производителя и составляли концентрации, при которых происходит практически полная (не менее 80%) репрессия транскрипции гена-мишени. Нокдаун от неспецифических эффектов дифференцировали с помощью набора siRNA AllStars Negative Control («Qiagen»),

который представляет собой несколько siRNA к мРНК генов, не имеющих гомологии ни с одним известным геном млекопитающих. Подтверждение селективного действия siRNA к гену-мишени было осуществлено с помощью метода Вестерн-блоттинг и ПЦР в реальном времени (данные не приводятся). Количество жизнеспособных клеток после нокдауна составляло не менее 80% от общего количества клеток. На следующий день (через 24 ч после трансфекции) клетки обрабатывали нетоксичными концентрациями TSA (0,12 мкМ), 5-aza (10 мкМ), CBL0137 (0,6 мкМ) и инкубировали в течение 24 ч. Конечная концентрация ДМСО в среде с клетками не превышала 0,1%. Затем проводили замену среды на свежую и через 48 ч клетки снимали с подложки с помощью 0,25% (v/v) раствора трипсин-ЭДТА («ПанЭко»), промывали фосфатно-солевым буфером (PBS) с последующим центрифугированием (250 g, 5 мин) и проводили проточную цитометрию с помощью прибора BD FACSCanto II («BD Biosciences», Бельгия). Для поддержания высокой жизнеспособности клеток при хранении клеточной суспензии был использован раствор PBS с 2%-ной FBS. В ходе анализа использовали синий лазер (488 нм) и канал FITC (530/30 нм).

Анализ реактивации эпигенетически репрессированного гена GFP при действии вориностата и нокдауне генов HDAC1/HMT в тест-системе HeLa TI. Вориностат («Selleckchem») растворяли в ДМСО, стоковая концентрация составляла 10 мМ. Клетки HeLa TI высевали и проводили трансфекцию siRNA к мРНК генов HDAC1 (GS3065), EZH2 (GS2146), SUV39H1 (GS6839), SUV39H2 (GS79723), SUV420H1 (GS51111), как описано ранее. Для нокдауна каждого из генов использовали набор из 4 siRNA. Концентрации siRNA были выбраны по рекомендациям производителя и составляли концентрации, при которых происходит практически полная (не менее 80%) репрессия транскрипции гена-мишени. Нокдаун от неспецифических эффектов дифференцировали с помощью набора siRNA AllStars Negative Control, как описано выше. Количество жизнеспособных клеток после нокдауна составляло не менее 80% от общего количества клеток. Через 24 ч после трансфекции клетки обрабатывали вориностатом (5 мкМ). Данная концентрация вориностата являлась нетоксичной для клеток при индивидуальном действии агента (жизнеспособность клеток составляла не менее 95% от процента жизнеспособных клеток в анализируемой популяции). Конечное содержание ДМСО при обработке клеток

составляло 0,1% (v/v). Через 24 ч после обработки проводили смену среды и через 48 часов осуществляли проточную цитометрию, как описано выше.

Анализ экспрессии гистоновых метилтрансфераз при действии вориностата. Для эксперимента использовали вориностат в концентрации 10 мМ, растворенный в ДМСО. Клетки HeLa TI высевали в 6-луночные планшеты по 250 000 клеток в лунку и инкубировали с вориностатом (5 мкМ) в течение 24 ч, а также с ДМСО (конечное содержание – 0,1% (v/v)) в качестве отрицательного контроля. Для получения общей фракции белка использовали буфер для анализа радиоиммунопреципитации (RIPA): 50 мМ Tris-HCl, 150 мМ NaCl (оба – «ПанЭко»), 1% (v/v) Triton X-100 («Ferak», Германия), 0,5% (w/v) дезоксихолат натрия («Диаэм», Россия), 0,1% (w/v) Ds-Na («Serva», Германия), коктейль ингибиторов протеаз («Roche», Швейцария). Клетки лизировали 1 ч при 4 °C, после чего лизаты центрифугировали (1790 g, 5 мин, 4 °C), отбирали супернатант, содержащий общую фракцию белков, и денатурировали белок в течение 5 мин в буфере для нанесения («Merck», Германия). Количественное определение белка проводили по методу Бредфорда [52]. Разделение белков проводили с помощью вертикального электрофореза в 10%-ном ПААГ в буфере Tris-Gly с Ds-Na (25 мМ Tris, 190 мМ Gly, 10% (w/v) Ds-Na), после чего осуществляли перенос белков на нитроцеллюлозную мембрану («Bio-Rad», США) с размером пор 0,45 мкм (условия переноса для белков 25–100 кДа: 250 мА, 1 ч; для белков 100–150 кДа: 100 В, 1 ч). Для исследования использовали кроличьи антитела («Abcam», Великобритания) к гистоновым метилтрансферазам: EZH2 (ab228697; разведение 1 : 7000), SUV39H1 (ab245380; разведение 1 : 3000), SUV39H2 (ab229493; разведение 1 : 3000), DOT1L (ab64077; разведение 1 : 500), G9a (ab183889; разведение 1 : 3000), GLP (ab241306; разведение 1 : 5000); а также кроличьи антитела («ThermoFisher Scientific», Германия): SUV420H1 (PA5-40926; разведение 1 : 3000) и SUV420H2 (PA-109891; разведение 1 : 3000).

Для контроля загрузки белка использовали кроличьи антитела к белку β-актин («Abcam»; разведение: 1 : 10 000). В качестве вторичных антител использовали козы антитела («Abcam»; разведение: 1 : 5000), конъюгированные с пероксидазой хрена. Для детекции белков использовали проявляющий реагент Clarity™ Western ECL Substrate («Bio-Rad») и систему цифровой обработки изображений ImageQuant LAS 4000 («GE Healthcare», США). Оценка белковых

полос была проведена с помощью программы ImageJ. Все эксперименты были выполнены в четырех независимых повторах.

Статистический анализ данных проводили с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 8.3.0. Нормальность распределения данных оценивали с помощью критерия Колмогорова–Смирнова. Для анализа значимости различий в количестве GFP⁺-клеток при действии агентов TSA, 5-aza, CBL0137 и нокдауне гена *HDAC1* использовали однофакторный дисперсионный анализ ANOVA с пост-тестом Тьюки для множественных сравнений. Для анализа значимости различий в доле GFP⁺-клеток при действии вориностата после нокдауна генов *HDAC1*, *EZH2*, *SUV39H1*, *SUV39H2*, *SUV420H1* использовали двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA с пост-тестом Тьюки. Оценку значимости различий уровней экспрессии гистоновых метилтрансфераз после обработки клеток вориностатом проводили с помощью *t*-теста Стьюдента. Пороговый уровень статистической значимости для всех методов составлял $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Основной эпигенетический эффект вориностата заключается в неселективном ингибировании HDAC. Наибольшее сродство агент проявляет к ферментам HDAC1, HDAC2, HDAC3 и HDAC6. Вориностат имеет близкие концентрации ингибирования HDAC1, HDAC3 и HDAC6, при этом падение экспрессии более выражено для белка HDAC1 [53, 54].

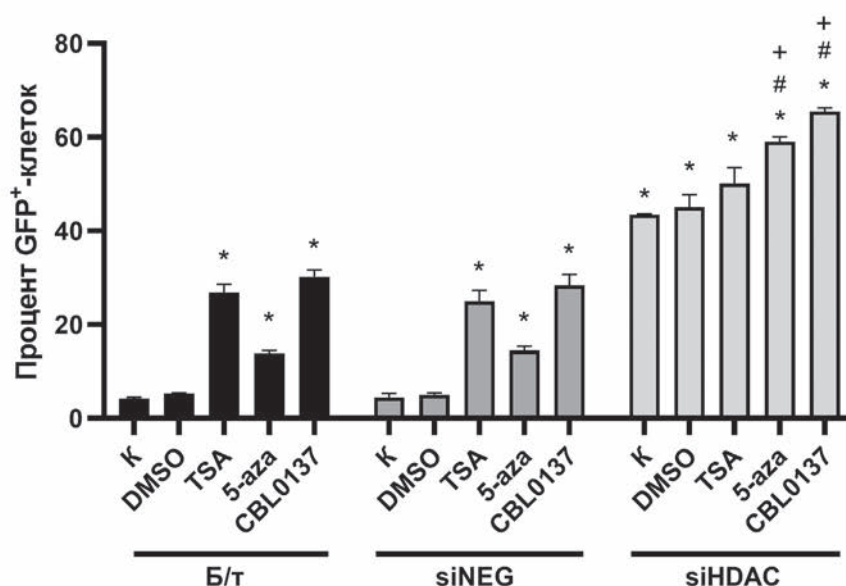
Тест-система HeLa T1 представляет собой популяцию клеток HeLa, несущих эпигенетически репрессированный вектор на основе вируса саркомы птиц, содержащий репортерный ген *GFP*. Эпигенетическая репрессия гена *GFP* в клетках HeLa T1 обусловлена действием более чем 15 факторов, включающих хроматин-модифицирующие ферменты различных классов, а также гистоновые шапероны [50]. При этом вклад ферментов HDAC в эпигенетическом сайленсинге гена *GFP* в тест-системе реализуется в основном за счет действия HDAC1 [55]. Ранее было показано, что популяция HeLa T1 чувствительна к широкому спектру эпигенетических модуляторов, в том числе ингибиторам HDAC, а также ингибиторам DNMT, HMT и BRD (белки из класса бромодоменов). Кроме того, тест-система может быть использована для анализа синергического эпигенетического эффекта химических соединений: при обработке клеток комбина-

циями эпимодуляторов с различным механизмом действия происходит увеличение уровня реактивации экспрессии *GFP* относительно индивидуального действия агентов [51]. Основываясь на этих данных, мы предположили, что наличие эпигенетических эффектов вориностата, не сопряженных с ингибированием HDAC, можно будет детектировать в клетках HeLa T1 при нокдауне гена *HDAC1*.

На первом этапе исследования было проведено моделирование эффектов ингибиторов с различным действием на гистоновые деацетилазы при нокдауне гена *HDAC1* в тест-системе HeLa T1 для дальнейшего определения характера эпигенетического действия вориностата. Для этого мы оценили уровень реактивации экспрессии гена *GFP* по количеству GFP⁺-клеток при нокдауне гена *HDAC1* и обработке модуляторами: (1) относящимся к ингибиторам HDAC (трихостатин А), (2) имеющим смешанный механизм действия (кураксин CBL0137) и (3) не влияющим на HDAC (5-азациитидин). Трихостатин А — ингибитор I и II классов HDAC из группы гидроксамовых кислот природного происхождения [56]; 5-азациитидин — нуклеозидный аналог цитидина, деметилирующий ДНК за счет ингибирования DNMT [57]. CBL0137 — низкомолекулярное соединение из группы кураксина второго поколения, является активатором супрессора опухолей белка p53, а также ингибирует гистоновый шаперон FACT, что приводит к интегральному ремоделированию хроматина и активации транскрипции [58]. Также, по данным Zhou et al. [59], CBL0137 увеличивает уровень ацетилирования гистона H3 и снижает количество модификаций H3K9me3 и H3K27me3 в промоторах генов интерферонового сигналинга. Было показано, что обработка клеток набором siRNA, не имеющих сродства к генам млекопитающих (siNEG), не приводила к статистически значимому изменению уровня реактивации *GFP* относительно нетрансфицированных клеток (Б/т) вне зависимости от обработки клеток. Уровень реактивации экспрессии *GFP* в Б/т-клетках составил 4,2%; в клетках, обработанных siNEG — 4,5% (рис. 1, а; рис. П1 в Приложении).

Обработка клеток ДМСО, используемого в качестве контроля растворителя, также не приводила к изменению количества GFP⁺-клеток по сравнению с необработанными клетками (Б/т-К, siNEG-К). При нокдауне *HDAC1* было зарегистрировано увеличение уровня реактивации экспрессии *GFP* до 43,5%, что превышает значения для необработанных клеток в 10 раз. Обработка клеток TSA

а



б

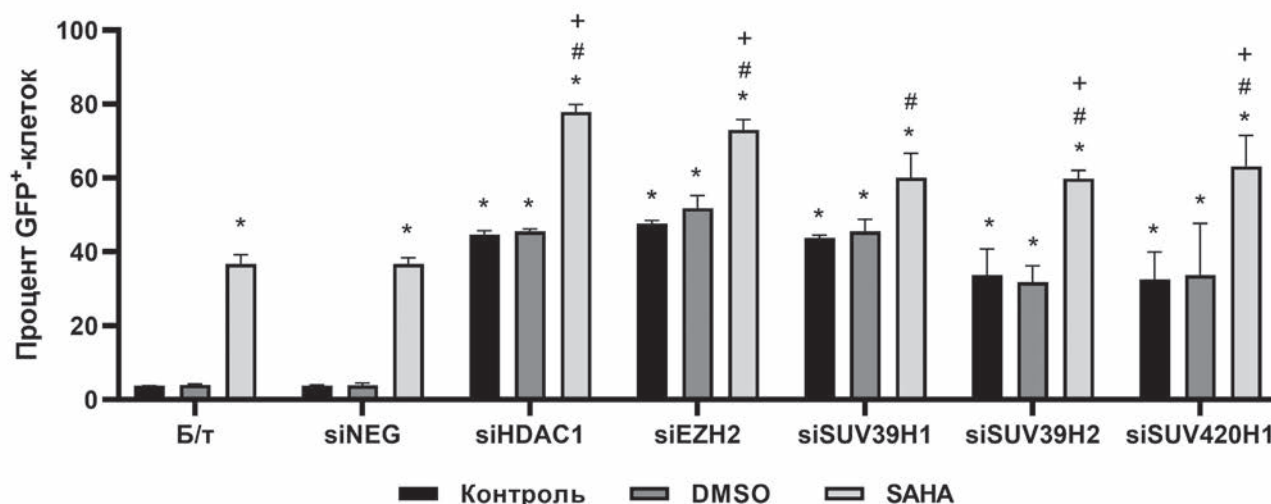


Рис. 1. Реактивация эпигенетически репрессированного гена *GFP* в тест-системе HeLa TI. *а* – При действии эпигенетических модуляторов TSA, 5-aza, CBL0137 и нокдауна *HDAC1*. *б* – При действии вориностата (SAHA) и нокдауна *HDAC1*, *EZH2*, *SUV39H1*, *SUV39H2*, *SUV420H1*. Результаты проточной цитометрии ($M \pm SD$). К – необработанные клетки, отрицательный контроль; Б/т – нетрансфицированные клетки; siNEG – клетки, трансфицированные siRNA, не имеющими гомологии ни с одним известным геном млекопитающих (отрицательный контроль трансфекции); «*» – количество GFP⁺-клеток при действии TSA/5-aza/CBL0137/SAHA или siRNA значительно различается по сравнению с отрицательным контролем (siNEG-K), $p < 0,01$; «#» – количество GFP⁺-клеток при действии TSA/5-aza/CBL0137/SAHA в группе с нокдауном значительно различается по сравнению с одноименными пробами в группе siNEG, $p < 0,05$; «+» – количество GFP⁺-клеток при действии TSA/5-aza/CBL0137/SAHA значительно различается по сравнению с отрицательным контролем внутри группы siHDAC1/siEZH2/siSUV39H1/siSUV39H2/siSUV420H1, $p < 0,05$

приводила к увеличению количества GFP⁺-клеток до 25% для нетрансфицированных клеток (Б/т-TSA) и до 27% – для клеток, обработанных siNEG. В то же время при нокдауне *HDAC1* и последующей обработке TSA уровень реактивации *GFP* составлял около 50%, что соответствовало индивидуальному действию siHDAC. В результате обработки клеток 5-aza происходило увеличение числа GFP⁺-клеток до 14%, а при действии 5-aza и нокдауне *HDAC1* –

до 59%, что может говорить о суммировании эффектов ингибирования экспрессии *HDAC1* и DNMT в тест-системе HeLa TI. Кураксин CBL0137 при индивидуальном действии вызывал увеличение уровня реактивации экспрессии *GFP* до 28–30%. После обработки клеток с нокдауном *HDAC1* происходило увеличение числа GFP⁺-клеток до 65,5%, что в 2 раза превышает эффект CBL0137 и практически в 1,5 раза – эффект siHDAC1. Результаты исследова-

дования демонстрируют, что при действии агента, не влияющего на HDAC, но влияющего на другие факторы эпигенетической репрессии гена *GFP* в тест-системе HeLa T1 (например, 5-aza), должно происходить суммирование эффектов нокдауна *HDAC1* и модулятора. При наличии перекрестных эффектов модулятора и нокдауна гена *HDAC1* будет наблюдаться частичное или полное перекрытие уровня реактивации *GFP*, как в случае с TSA. При действии эпигенетического модулятора широкого действия, не ограничивающегося влиянием на HDAC, как в случае CBL0137, будет происходить значительное усиление реактивации экспрессии *GFP*.

На следующем этапе исследования был осуществлен анализ характера эпигенетического действия вориностата в клетках HeLa T1 при нокдауне гена *HDAC1*, а также ряда генов метилтрансфераз: *EZH2*, *SUV39H1*, *SUV39H2*, *SUV420H1*. *EZH2* — метилтрансфераза семейства KMT6, входит в состав репрессивного белкового комплекса PRC2 и опосредует ди- и триметилирование сайта H3K27, ассоциированного с репрессией транскрипции [13]. Гомологи *SUV39H1* и *SUV39H2* относятся к классу метилтрансфераз KMT1 и опосредуют триметилирование сайта H3K9. Белок *SUV420H1*, наравне со своим гомологом *SUV420H2*, является ключевым ферментом в триметилировании H4K20me3 и играет важную роль в репликации и репарации ДНК, а также в регуляции клеточного цикла [60]. Образование модификаций H3K9me3 и H4K20me3 способствует запуску механизма метилирования ДНК посредством рекрутирования гетерохроматинового белка HP1 и DNMT, таким образом, способствуя репрессии транскрипции [61, 62]. H3K9me3 и H4K20me3 играют важную роль для образования плотной структуры хроматина в перичентрических и теломерных повторах гетерохроматина, а также участвуют в замалчивании экспрессии генов в эухроматине [63, 64].

Количество GFP⁺-клеток в отрицательном контроле (Б/т-К) составило 3,7%, в контроле трансфекции (siNEG-K) — 3,4% (рис. 1, б; рис. П2 в Приложении). Как и ранее, действие siNEG не приводило к изменению профиля реактивации гена *GFP* по сравнению с Б/т-клетками. При действии ДМСО (контроль растворителя) статистически значимого изменения количества GFP⁺-клеток зарегистрировано не было. Нокдаун *HDAC1* вызывал реактивацию экспрессии *GFP* в 45% клеток. Вориностат вызывал реактивацию в 37% клеток (рис. 1, б). Действие вориностата при нокдауне *HDAC1* приводило к увеличению доли GFP⁺-клеток до 78%, что превышало уровень реактивации

как при индивидуальном действии вориностата (в 2,1 раза), так и при нокдауне *HDAC1* (в 1,7 раза). Таким образом, при действии ингибитора HDAC вориностата и нокдауне *HDAC1* в тест-системе HeLa T1 происходит увеличение количества GFP⁺-клеток, что свидетельствует о дополнительном HDAC-независимом эпигенетическом эффекте соединения.

Нокдаун генов *EZH2*, *SUV39H1*, *SUV39H2* и *SUV420H1* вызывал значительное увеличение количества GFP⁺-клеток относительно отрицательного контроля: *EZH2* (48%; 12,9 раза), *SUV39H1* (44%; 11,8 раза), *SUV39H2* (34%; 9,1 раза), *SUV420H1* (33%; 8,8 раза) (рис. 1, б). Анализ степени реактивации экспрессии *GFP* при действии вориностата и нокдауне *EZH2* выявил увеличение числа GFP⁺-клеток до 73%, что в 1,5 раза превышает эффект siEZH2 и в 2 раза — эффект вориностата. В то же время при нокдауне *SUV39H1* с последующей обработкой вориностатом наблюдалась устойчивая тенденция к росту популяции GFP⁺-клеток относительно индивидуального действия siRNA и агента (в 1,4 и в 1,6 раза соответственно). Обработка клеток вориностатом после нокдауна гена *SUV39H2* приводила к реактивации экспрессии *GFP* в 60% клеток, что в 1,8 раза и 1,6 раза больше, чем при индивидуальном действии siSUV39H2 и вориностата соответственно. Обработка клеток вориностатом при нокдауне *SUV420H1* вызывала увеличение количества GFP⁺-клеток до 63,2%, что в 1,9 раза больше относительно эффекта siSUV420H1 и в 1,7 раза — относительно эффекта вориностата. Полученные результаты демонстрируют «пересечение» эффектов вориностата и нокдауна генов *EZH2*, *SUV39H2* и *SUV420H1*, что говорит о потенциальном влиянии вориностата на эти ферменты. Стоит заметить, что нокдаун генов *SUV39H1*, *SUV39H2* и *SUV420H1* в клетках HeLa T1 с последующей обработкой вориностатом вызывал снижение процента жизнеспособных клеток до 65%. Высокая токсичность может быть объяснена тем, что метилтрансферазы *SUV39H1*, *SUV39H2* и *SUV420H1* являются ключевыми ферментами, катализирующими модификации H3K9me3 и H4K20me3, которые играют ключевую роль в организации структуры хромосом и потеря которых может быть критична даже при краткосрочном действии siRNA [65].

Полученные на модельной системе HeLa T1 данные свидетельствовали о том, что вориностат способен неселективно ингибировать экспрессию целого ряда гистоновых метилтрансфераз. В связи с этим на заключительном этапе исследования была поставлена задача

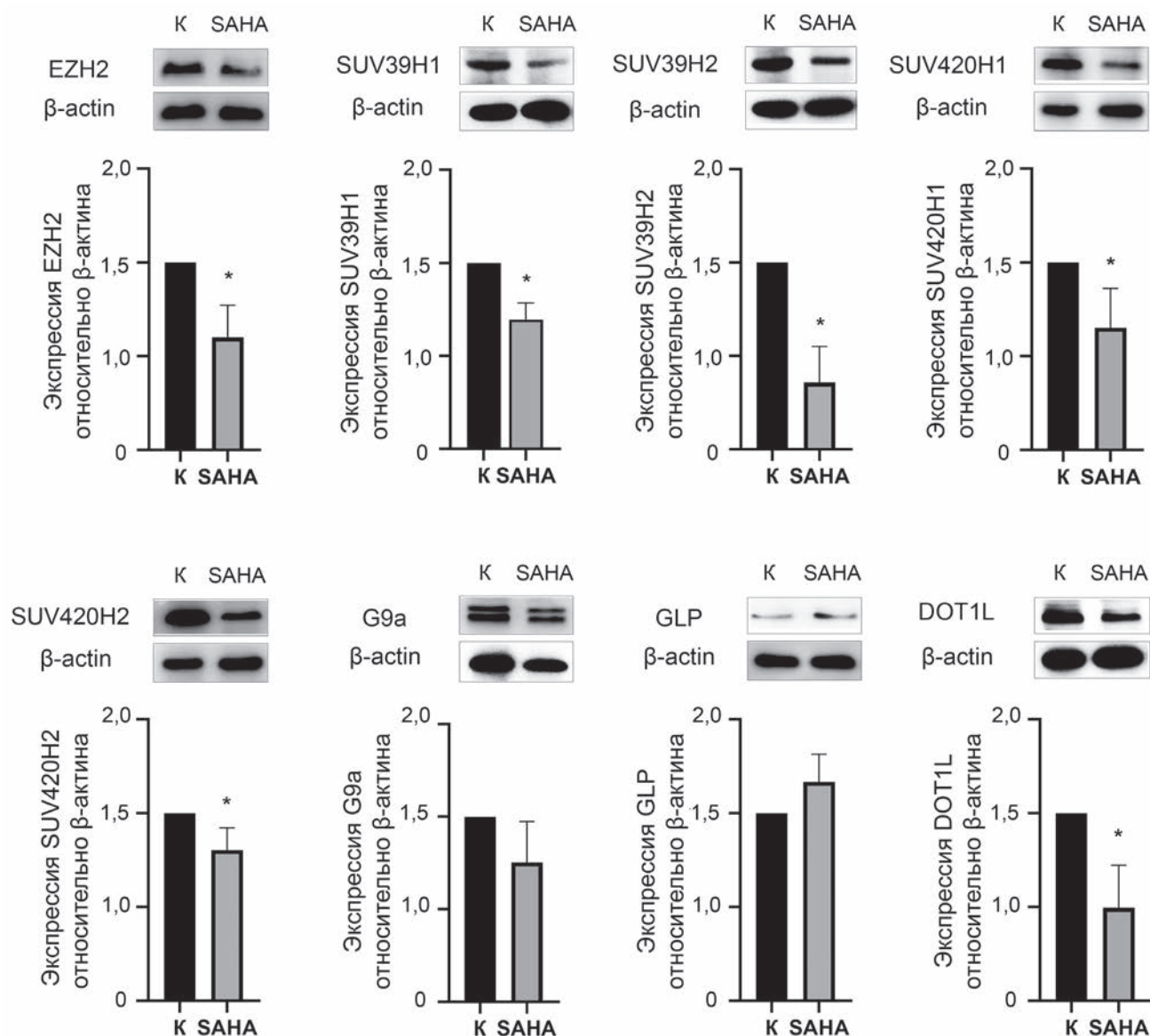


Рис. 2. Уровень экспрессии гистоновых метилтрансфераз при действии вориностата (SAHA). Результаты и денситометрический анализ Вестерн-блоттинга ($M \pm SD$). К – отрицательный контроль; «*» – различия статистически значимы относительно отрицательного контроля; $p < 0,05$

с использованием альтернативного подхода, а именно Вестерн-блоттинга, оценить влияние вориностата на уровень содержания не только ферментов, для которых был продемонстрирован эффект на модельной системе HeLa TI, но и ряда других метилтрансфераз гистонов, вовлеченных в прогрессию ЗНО. Таким образом, в перечень исследуемых были добавлены метилтрансферазы SUV420H2, G9a, GLP и DOT1L. Родственные метилтрансферазы G9a и GLP функционируют в составе гетеродимерного комплекса и опосредуют моно- и диметилирование H3K9, а также индуцируют процесс метилирования ДНК [66]. Белок DOT1L – метилтрансфераза, представляющая класс KMT4, катализирует моно-, ди- и

триметилирование H3K79. DOT1L участвует во многих клеточных процессах, включая геномный импринтинг, ответ на повреждение ДНК, а также процессы более высокого уровня – эритропоэз, дифференцировка клеток, эмбриональное развитие [67]. Сверхэкспрессия DOT1L приводит к активации транскрипции, в том числе теломерных последовательностей [68]. Более того, метилирование H3K79, опосредованное DOT1L, ограничивает рекрутирование репрессивных белков в гетерохроматиновые области [69].

Было продемонстрировано, что при действии вориностата происходит общее снижение экспрессии белка EZH2 в 1,8 раза (рис. 2). Полученные данные хорошо согласуются с результа-

тами исследования Nordstrom et al. [49], показавших снижение уровня EZH2 и модификации H3K27me3 в промоторной области гена *SOX11*, кодирующего фактор транскрипции 11, при действии 5 мкМ вориностата. Кроме того, Shi et al. [70] сообщали о высокой чувствительности клеток немелкоклеточного рака легких с высоким уровнем экспрессии EZH2 к обработке вориностатом, а также о положительной корреляции экспрессии ферментов EZH2 и HDAC1.

Также было выявлено, что при действии вориностата происходит значимое снижение количества белков SUV39H1 (в 1,6 раза) и SUV39H2 (в 2,8 раза), ответственных за модификацию H3K9me3 (рис. 2). Наблюдаемый эффект вориностата на метилтрансферазу SUV39H1 согласуется с данными Natarajan et al. [48], которые продемонстрировали на модели рака яичника *in vitro* снижение экспрессии метилтрансфераз DNMT3A, SUV39H1 и PRMT1 при действии сопоставимой дозы вориностата (7,5 мкМ). Для белков GLP и G9a, входящих в комплекс, опосредующий диметилирование H3K9, не было зарегистрировано статистически значимого изменения уровня экспрессии. Однако при этом наблюдалась тенденция к снижению количества G9a (в 1,4 раза). Нами также было показано, что вориностат вызывает снижение экспрессии метилтрансфераз SUV420H1 и SUV420H2, опосредующих метилирование репрессивной метки H4K20me3, в 1,3 и 1,5 раза соответственно. Выявленное влияние вориностата на данные белки может объяснять его способность вызывать реорганизацию хроматина, что возможно связано с установленным для вориностата генотоксическим действием [71, 72]. Также нами было продемонстрировано, что после обработки клеток вориностатом происходит ингибирование экспрессии (в 2 раза) белка DOT1L, ответственного за метилирование сайта H3K79. Влияние вориностата на ферменты SUV39H2, SUV420H1, SUV420H2 и DOT1L в опубликованных ранее данных не было описано.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящем исследовании было показано, что эпигенетические эффекты вориностата, помимо ингибирования HDAC, распространяются и на гистоновые метилтрансферазы. Нами впервые была показана способность вориностата снижать интегральный уровень гистоновых метилтрансфераз SUV39H2, SUV420H1, SUV420H2 и DOT1L, которые гиперэкспрессированы при различных ЗНО. Новые данные о механизме эпигенетического действия вориностата будут способствовать более адекватному использованию данного препарата в противоопухолевой терапии, а также должны способствовать пониманию молекулярных механизмов его побочных эффектов. В совокупности, полученные данные могут послужить механистической базой для расширения области применения вориностата, и, как следствие, увеличения эффективности терапии опухолей с aberrантным эпигенетическим профилем.

Вклад авторов. В.П.М., К.И.К., М.Г.Я. — разработка концепции исследования; К.И.К., М.Г.Я. — руководство исследованием, редактирование текста; В.П.М., Ю.В.М. — написание текста; В.П.М., Ю.В.М., В.Г.П., А.Ю.П., О.Г.У., Е.С.Т., Е.М.Ж. — проведение экспериментов; В.П.М., Ю.В.М., Е.М.Ж. — подготовка иллюстраций; В.П.М., К.И.К., М.Г.Я., Г.А.Б. — обсуждение результатов исследования.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 21-75-10163).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

Дополнительные материалы. Приложение к статье опубликовано на сайте журнала «Биохимия» (<https://biochemistrymoscow.com>).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tian, X., Zhang, S., Liu, H. M., Zhang, Y. B., Blair, C. A., Mercola, D., Sassone-Corsi, P., and Zi, X. (2013) Histone lysine-specific methyltransferases and demethylases in carcinogenesis: new targets for cancer therapy and prevention, *Curr. Cancer Drug Targets*, **13**, 558-579, doi: 10.2174/1568009611313050007.
2. Zhao, S., Allis, C. D., and Wang, G. G. (2021) The language of chromatin modification in human cancers, *Nat. Rev. Cancer*, **21**, 413-430, doi: 10.1038/s41568-021-00357-x.
3. Lam, U. T. F., Tan, B. K. Y., Poh, J. J. X., and Chen, E. S. (2022) Structural and functional specificity of H3K36 methylation, *Epigenetics Chromatin*, **15**, 17, doi: 10.1186/s13072-022-00446-7.
4. Greer, E. L., and Shi, Y. (2012) Histone methylation: a dynamic mark in health, disease and inheritance.

- itance, *Nat. Rev. Genet.*, **13**, 343-357, doi: 10.1038/nrg3173.
5. Santos-Rosa, H., Schneider, R., Bannister, A. J., Sherrieff, J., Bernstein, B. E., Emre, N. C., Schreiber, S. L., Mellor, J., and Kouzarides, T. (2002) Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3, *Nature*, **419**, 407-411, doi: 10.1038/nature01080.
 6. Farooq, Z., Banday, S., Pandita, T. K., and Altaf, M. (2016) The many faces of histone H3K79 methylation, *Mutat. Res. Rev. Mutat. Res.*, **768**, 46-52, doi: 10.1016/j.mrrrev.2016.03.005.
 7. Cutter DiPiazza, A. R., Taneja, N., Dhakshnamoorthy, J., Wheeler, D., Holla, S., and Grewal, S. I. S. (2021) Spreading and epigenetic inheritance of heterochromatin require a critical density of histone H3 lysine 9 tri-methylation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **118**, e2100699118, doi: 10.1073/pnas.2100699118.
 8. Schotta, G., Lachner, M., Sarma, K., Ebert, A., Sengupta, R., Reuter, G., Reinberg, D., and Jenuwein, T. (2004) A silencing pathway to induce H3-K9 and H4-K20 trimethylation at constitutive heterochromatin, *Genes Dev.*, **18**, 1251-1262, doi: 10.1101/gad.300704.
 9. Padeken, J., Methot, S. P., and Gasser, S. M. (2022) Establishment of H3K9-methylated heterochromatin and its functions in tissue differentiation and maintenance, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **23**, 623-640, doi: 10.1038/s41580-022-00483-w.
 10. Murakami, Y. (2013) Heterochromatin and Euchromatin, in *Encyclopedia of Systems Biology* (Dubitzky, W., Wolkenhauer, O., Cho, K.-H., and Yokota, H. eds) Springer New York, New York, NY, pp. 881-884, doi: 10.1007/978-1-4419-9863-7_1413.
 11. Dimitrova, E., Turberfield, A. H., and Klose, R. J. (2015) Histone demethylases in chromatin biology and beyond, *EMBO Rep.*, **16**, 1620-1639, doi: 10.15252/embr.201541113.
 12. Taylor-Papadimitriou, J., and Burchell, J. M. (2022) Histone methylases and demethylases regulating antagonistic methyl marks: changes occurring in cancer, *Cells*, **11**, 1113, doi: 10.3390/cells11071113.
 13. Chen, Y., Ren, B., Yang, J., Wang, H., Yang, G., Xu, R., You, L., and Zhao, Y. (2020) The role of histone methylation in the development of digestive cancers: a potential direction for cancer management, *Signal. Transduct. Target Ther.*, **5**, 143, doi: 10.1038/s41392-020-00252-1.
 14. Yang, Y., Zhang, M., and Wang, Y. (2022) The roles of histone modifications in tumorigenesis and associated inhibitors in cancer therapy, *J. Natl. Cancer Center*, **2**, 277-290, doi: 10.1016/j.jncc.2022.09.002.
 15. Lee, S. H., Li, Y., Kim, H., Eum, S., Park, K., and Lee, C. H. (2022) The role of EZH1 and EZH2 in development and cancer, *BMB Rep.*, **55**, 595-601, doi: 10.5483/BMBRep.2022.55.12.174.
 16. Duan, D., Shang, M., Han, Y., Liu, J., Liu, J., Kong, S. H., Hou, J., Huang, B., Lu, J., and Zhang, Y. (2022) EZH2-CCF-cGAS Axis Promotes Breast Cancer Metastasis, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 1788, doi: 10.3390/ijms23031788.
 17. Entezari, M., Taheriazam, A., Paskeh, M. D. A., Sabouni, E., Zandieh, M. A., Aboutaleb, M., Kakavand, A., Rezaei, S., Hejazi, E. S., Saebfar, H., Salimimoghadam, S., Mirzaei, S., Hashemi, M., and Samarghandian, S. (2023) The pharmacological and biological importance of EZH2 signaling in lung cancer, *Biomed. Pharmacother.*, **160**, 114313, doi: 10.1016/j.biopha.2023.114313.
 18. Zakharova, V. V., Magnitov, M. D., Del Maestro, L., Ulianov, S. V., Glentis, A., Uyanik, B., Williard, A., Karpukhina, A., Demidov, O., Joliot, V., Vassetzky, Y. S., Mege, R. M., Piel, M., Razin, S. V., and Ait-Si-Ali, S. (2022) SETDB1 fuels the lung cancer phenotype by modulating epigenome, 3D genome organization and chromatin mechanical properties, *Nucleic Acids Res.*, **50**, 4389-4413, doi: 10.1093/nar/gkac234.
 19. Liu, Z., Liu, J., Ebrahimi, B., Pratap, U. P., He, Y., Altwegg, K. A., Tang, W., Li, X., Lai, Z., Chen, Y., Shen, L., Sareddy, G. R., Viswanadhapalli, S., Tekmal, R. R., Rao, M. K., and Vadlamudi, R. K. (2022) SETDB1 interactions with PELP1 contributes to breast cancer endocrine therapy resistance, *Breast Cancer Res.*, **24**, 26, doi: 10.1186/s13058-022-01520-4.
 20. Zhang, L., Tian, S., Zhao, M., Yang, T., Quan, S., Song, L., and Yang, X. (2021) SUV39H1-mediated DNMT1 is involved in the epigenetic regulation of Smad3 in cervical cancer, *Anticancer Agents Med. Chem.*, **21**, 756-765, doi: 10.2174/1871520620666200721110016.
 21. Saha, N., and Muntean, A. G. (2021) Insight into the multi-faceted role of the SUV family of H3K9 methyltransferases in carcinogenesis and cancer progression, *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer*, **1875**, 188498, doi: 10.1016/j.bbcan.2020.188498.
 22. Vougiouklakis, T., Sone, K., Saloura, V., Cho, H. S., Suzuki, T., Dohmae, N., Alachkar, H., Nakamura, Y., and Hamamoto, R. (2015) SUV420H1 enhances the phosphorylation and transcription of ERK1 in cancer cells, *Oncotarget*, **6**, 43162-43171, doi: 10.18632/oncotarget.6351.
 23. Moshiri, A., Cheng, H., Kim, S., and Saloura, V. J. (2023) SUV420H1 as a novel target in HPV-negative head and neck squamous cell carcinoma, *Cancer Res.*, **83**, 6284, doi: 10.1158/1538-7445.AM2023-6284.
 24. Viotti, M., Wilson, C., McClelland, M., Koeppen, H., Haley, B., Jhunjunwala, S., Klijn, C., Modrusan, Z., Arnott, D., Classon, M., Stephan, J. P., and Mellman, I. (2018) SUV420H2 is an epigenetic regulator of epithelial/mesenchymal states in pancreatic cancer, *J. Cell Biol.*, **217**, 763-777, doi: 10.1083/jcb.201705031.
 25. Nachiyappan, A., Gupta, N., and Taneja, R. (2022) EHMT1/EHMT2 in EMT, cancer stemness and drug resistance: emerging evidence and mechanisms, *FEBS J.*, **289**, 1329-1351, doi: 10.1111/febs.16334.
 26. Alexandrova, E., Salvati, A., Pecoraro, G., Lamberti, J., Melone, V., Sellitto, A., Rizzo, F., Giurato, G.,

- Tarallo, R., Nassa, G., and Weisz, A. (2022) Histone methyltransferase DOT1L as a promising epigenetic target for treatment of solid tumors, *Front. Genet.*, **13**, 864612, doi: 10.3389/fgene.2022.864612.
27. Wu, Y., Wang, Z., Han, L., Guo, Z., Yan, B., Guo, L., Zhao, H., Wei, M., Hou, N., Ye, J., Wang, Z., Shi, C., Liu, S., Chen, C., Chen, S., Wang, T., Yi, J., Zhou, J., Yao, L., Zhou, W., et al. (2022) PRMT5 regulates RNA m6A demethylation for doxorubicin sensitivity in breast cancer, *Mol. Ther.*, **30**, 2603-2617, doi: 10.1016/j.ymthe.2022.03.003.
28. Chen, Z., Gan, J., Wei, Z., Zhang, M., Du, Y., Xu, C., and Zhao, H. (2022) The emerging role of PRMT6 in cancer, *Front. Oncol.*, **12**, 841381, doi: 10.3389/fonc.2022.841381.
29. Jiang, H., Li, Y., Xiang, X., Tang, Z., Liu, K., Su, Q., Zhang, X., and Li, L. (2021) Chaetocin: A review of its anticancer potentials and mechanisms, *Eur. J. Pharmacol.*, **910**, 174459, doi: 10.1016/j.ejphar.2021.174459.
30. Zhang, S., Guo, J., Zhang, H., Tong, L., and Zhang, L. (2023) Gliotoxin induced ferroptosis by downregulating SUV39H1 expression in esophageal cancer cells, *Recent Pat. Anticancer Drug Discov.*, **18**, 397-407, doi: 10.2174/1574892817666220905114120.
31. Rahman, Z., Bazaz, M. R., Devabattula, G., Khan, M. A., and Godugu, C. (2021) Targeting H3K9 methyltransferase G9a and its related molecule GLP as a potential therapeutic strategy for cancer, *J. Biochem. Mol. Toxicol.*, **35**, e22674, doi: 10.1002/jbt.22674.
32. Lin, H. Y., Wu, H. J., Chen, S. Y., Hou, M. F., Lin, C. S., and Chu, P. Y. (2022) Epigenetic therapy combination of UNC0638 and CI-994 suppresses breast cancer via epigenetic remodeling of BIRC5 and GADD45A, *Biomed. Pharmacother.*, **145**, 112431, doi: 10.1016/j.biopha.2021.112431.
33. Rugo, H. S., Jacobs, I., Sharma, S., Scappaticci, F., Paul, T. A., Jensen-Pergakes, K., and Malouf, G. G. (2020) The promise for histone methyltransferase inhibitors for epigenetic therapy in clinical oncology: a narrative review, *Adv. Ther.*, **37**, 3059-3082, doi: 10.1007/s12325-020-01379-x.
34. Stein, E. M., Garcia-Manero, G., Rizzieri, D. A., Tibes, R., Berdeja, J. G., Savona, M. R., Jongen-Lavrenic, M., Altman, J. K., Thomson, B., Blakemore, S. J., Daigle, S. R., Waters, N. J., Suttle, A. B., Clawson, A., Pollock, R., Krivtsov, A., Armstrong, S. A., DiMartino, J., Hedrick, E., Lowenberg, B., and Tallman, M. S. (2018) The DOT1L inhibitor pinometostat reduces H3K79 methylation and has modest clinical activity in adult acute leukemia, *Blood*, **131**, 2661-2669, doi: 10.1182/blood-2017-12-818948.
35. Marzochi, L. L., Cuzziol, C. I., Nascimento Filho, C., Dos Santos, J. A., Castanhole-Nunes, M. M. U., Pavarino, E. C., Guerra, E. N. S., and Goloni-Bertollo, E. M. (2023) Use of histone methyltransferase inhibitors in cancer treatment: a systematic review, *Eur. J. Pharmacol.*, **944**, 175590, doi: 10.1016/j.ejphar.2023.175590.
36. Hoy, S. M. (2020) Tazemetostat: first approval, *Drugs*, **80**, 513-521, doi: 10.1007/s40265-020-01288-x.
37. Richon, V. M. (2006) Cancer biology: mechanism of antitumour action of vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid), a novel histone deacetylase inhibitor, *Br. J. Cancer*, **95**, S2-S6, doi: 10.1038/sj.bjc.6603463.
38. Siegel, D., Hussein, M., Belani, C., Robert, F., Galanis, E., Richon, V. M., Garcia-Vargas, J., Sanz-Rodriguez, C., and Rizvi, S. (2009) Vorinostat in solid and hematologic malignancies, *J. Hematol. Oncol.*, **2**, 31, doi: 10.1186/1756-8722-2-31.
39. Singh, B. N., Zhang, G., Hwa, Y. L., Li, J., Dowdy, S. C., and Jiang, S. W. (2010) Nonhistone protein acetylation as cancer therapy targets, *Expert Rev. Anticancer Ther.*, **10**, 935-954, doi: 10.1586/era.10.62.
40. Lee, Y. J., Won, A. J., Lee, J., Jung, J. H., Yoon, S., Lee, B. M., and Kim, H. S. (2012) Molecular mechanism of SAHA on regulation of autophagic cell death in tamoxifen-resistant MCF-7 breast cancer cells, *Int. J. Med. Sci.*, **9**, 881-893, doi: 10.7150/ijms.5011.
41. Brown, S., Pawlyn, C., Tillotson, A.-L., Sherratt, D., Flanagan, L., Low, E., Morgan, G. J., Williams, C., Kaiser, M., Davies, F. E., and Jenner, M. W. (2021) Bortezomib, vorinostat, and dexamethasone combination therapy in relapsed myeloma: results of the phase 2 MUK four trial, *Clin. Lymphoma Myeloma Leuk.*, **21**, 154-161.e153, doi: 10.1016/j.clml.2020.11.019.
42. Bilotti, E., Vesole, D. H., McBride, L., Schmidt, L., Gao, Z., Gilani, M., McNeill, A., Bednarz, U., Richter, J., Mato, A., Graef, T., and Siegel, D. S. (2016) Vorinostat in combination with lenalidomide and dexamethasone in lenalidomide-refractory multiple myeloma, *Clin. Lymphoma Myeloma Leuk.*, **16**, 558-562, doi: 10.1016/j.clml.2016.08.001.
43. Wang, Y., Janku, F., Piha-Paul, S., Hess, K., Broadus, R., Liu, L., Shi, N., Overman, M., Kopetz, S., Subbiah, V., Naing, A., Hong, D., Tsimberidou, A. M., Karp, D., Yao, J., and Fu, S. (2020) Phase I studies of vorinostat with ixazomib or pazopanib imply a role of antiangiogenesis-based therapy for TP53 mutant malignancies, *Sci. Rep.*, **10**, 3080, doi: 10.1038/s41598-020-58366-z.
44. Prebet, T., Braun, T., Beyne-Rauzy, O., Dreyfus, F., Stamatoullas, A., Wattel, E., Ame, S., Raffoux, E., Delaunay, J., Charbonnier, A., Ades, L., Fenaux, P., and Vey, N. (2014) Combination of vorinostat and low dose cytarabine for patients with azacitidine-refractory/relapsed high risk myelodysplastic syndromes, *Leuk. Res.*, **38**, 29-33, doi: 10.1016/j.leukres.2013.07.023.
45. DuBois, S. G., Granger, M. M., Groshen, S., Tsao-Wei, D., Ji, L., Shamirian, A., Czarnecki, S., Goodarzi, F., Berkovich, R., Shimada, H., Villablanca, J. G., Vo, K. T., Pinto, N., Mosse, Y. P., Maris, J. M., Shusterman, S., Cohn, S. L., Goldsmith, K. C., Weiss, B., Yanik, G. A., Twist, C. J., Irwin, M. S.,

- Haas-Kogan, D. A., Park, J. R., Marachelian, A., and Matthay, K. K. (2021) Randomized phase II trial of MIBG versus MIBG, vincristine, and irinotecan versus MIBG and vorinostat for patients with relapsed or refractory neuroblastoma: a report from NANT consortium, *J. Clin. Oncol.*, **39**, 3506-3514, doi: 10.1200/JCO.21.00703.
46. Huang, P. H., Chen, C. H., Chou, C. C., Sargeant, A. M., Kulp, S. K., Teng, C. M., Byrd, J. C., and Chen, C. S. (2011) Histone deacetylase inhibitors stimulate histone H3 lysine 4 methylation in part via transcriptional repression of histone H3 lysine 4 demethylases, *Mol. Pharmacol.*, **79**, 197-206, doi: 10.1124/mol.110.067702.
47. Li, C. T., Hsiao, Y. M., Wu, T. C., Lin, Y. W., Yeh, K. T., and Ko, J. L. (2011) Vorinostat, SAHA, represses telomerase activity via epigenetic regulation of telomerase reverse transcriptase in non-small cell lung cancer cells, *J. Cell Biochem.*, **112**, 3044-3053, doi: 10.1002/jcb.23229.
48. Natarajan, U., Venkatesan, T., and Rathinavelu, A. (2021) Effect of the HDAC inhibitor on histone acetylation and methyltransferases in A2780 ovarian cancer cells, *Medicina (Kaunas)*, **57**, 456, doi: 10.3390/medicina57050456.
49. Nordstrom, L., Andersson, E., Kuci, V., Gustavsson, E., Holm, K., Ringner, M., Guldberg, P., and Ek, S. (2015) DNA methylation and histone modifications regulate SOX11 expression in lymphoid and solid cancer cells, *BMC Cancer*, **15**, 273, doi: 10.1186/s12885-015-1208-y.
50. Poleshko, A., Einarson, M. B., Shalginskikh, N., Zhang, R., Adams, P. D., Skalka, A. M., and Katz, R. A. (2010) Identification of a functional network of human epigenetic silencing factors, *J. Biol. Chem.*, **285**, 422-433, doi: 10.1074/jbc.M109.064667.
51. Maksimova, V., Shalginskikh, N., Vlasova, O., Usalka, O., Beizer, A., Bugaeva, P., Fedorov, D., Lizogub, O., Lesovaya, E., Katz, R., Belitsky, G., Kirsanov, K., and Yakubovskaya, M. (2021) HeLa TI cell-based assay as a new approach to screen for chemicals able to reactivate the expression of epigenetically silenced genes, *PLoS One*, **16**, e0252504, doi: 10.1371/journal.pone.0252504.
52. Kruger, N. J. (2009) The Bradford Method For Protein Quantitation, in *The Protein Protocols Handbook* (Walker, J. M., ed.) Humana Press, Totowa, NJ, pp. 17-24, doi: 10.1007/978-1-59745-198-7_4.
53. Suzuki, T., Kasuya, Y., Itoh, Y., Ota, Y., Zhan, P., Asamitsu, K., Nakagawa, H., Okamoto, T., and Miyata, N. (2013) Identification of highly selective and potent histone deacetylase 3 inhibitors using click chemistry-based combinatorial fragment assembly, *PLoS One*, **8**, e68669, doi: 10.1371/journal.pone.0068669.
54. Kurundkar, D., Srivastava, R. K., Chaudhary, S. C., Ballesta, M. E., Kopelovich, L., Elmets, C. A., and Athar, M. (2013) Vorinostat, an HDAC inhibitor attenuates epidermoid squamous cell carcinoma growth by dampening mTOR signaling pathway in a human xenograft murine model, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **266**, 233-244, doi: 10.1016/j.taap.2012.11.002.
55. Poleshko, A., Kossenkova, A. V., Shalginskikh, N., Pecherskaya, A., Einarson, M. B., Skalka, A. M., and Katz, R. A. (2014) Human factors and pathways essential for mediating epigenetic gene silencing, *Epigenetics*, **9**, 1280-1289, doi: 10.4161/epi.32088.
56. Xiao, W., Chen, X., Liu, X., Luo, L., Ye, S., and Liu, Y. (2014) Trichostatin A, a histone deacetylase inhibitor, suppresses proliferation and epithelial-mesenchymal transition in retinal pigment epithelium cells, *J. Cell. Mol. Med.*, **18**, 646-655, doi: 10.1111/jcmm.12212.
57. Christman, J. K. (2002) 5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy, *Oncogene*, **21**, 5483-5495, doi: 10.1038/sj.onc.1205699.
58. Jin, M. Z., Xia, B. R., Xu, Y., and Jin, W. L. (2018) Curaxin CBL0137 exerts anticancer activity via diverse mechanisms, *Front. Oncol.*, **8**, 598, doi: 10.3389/fonc.2018.00598.
59. Zhou, D., Park, J. G., Wu, Z., Huang, H., Fiches, G. N., Biswas, A., Li, T. W., Ma, Q., Martinez-Sobrido, L., Santoso, N., and Zhu, J. (2021) FACT subunit SUPT16H associates with BRD4 and contributes to silencing of antiviral interferon signaling, *bioRxiv*, doi: 10.1101/2021.04.21.440833.
60. Gabellini, D., and Pedrotti, S. (2022) The SUV4-20H histone methyltransferases in health and disease, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 4736, doi: 10.3390/ijms23094736.
61. Lachner, M., O'Carroll, D., Rea, S., Mechtler, K., and Jenuwein, T. (2001) Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins, *Nature*, **410**, 116-120, doi: 10.1038/35065132.
62. Ren, W., Fan, H., Grimm, S. A., Kim, J. J., Li, L., Guo, Y., Petell, C. J., Tan, X.-F., Zhang, Z.-M., Coan, J. P., Yin, J., Kim, D. I., Gao, L., Cai, L., Khudaverdyan, N., Çetin, B., Patel, D. J., Wang, Y., Cui, Q., Strahl, B. D., Gozani, O., Miller, K. M., O'Leary, S. E., Wade, P. A., Wang, G. G., and Song, J. (2021) DNMT1 reads heterochromatic H4K20me3 to reinforce LINE-1 DNA methylation, *Nat. Commun.*, **12**, 2490, doi: 10.1038/s41467-021-22665-4.
63. Dang-Nguyen, T. Q., Haraguchi, S., Furusawa, T., Somfai, T., Kaneda, M., Watanabe, S., Akagi, S., Kikuchi, K., Tajima, A., and Nagai, T. (2013) Down-regulation of histone methyltransferase genes SUV39H1 and SUV39H2 increases telomere length in embryonic stem-like cells and embryonic fibroblasts in pigs, *J. Reprod. Dev.*, **59**, 27-32, doi: 10.1262/jrd.2012-118.
64. Abini-Agbomson, S., Gretarsson, K., Shih, R. M., Hsieh, L., Lou, T., Ioannes, P. D., Vasilyev, N., Lee, R., Wang, M., Simon, M., Armache, J.-P., Nudler, E., Narlikar, G., Liu, S., Lu, C., and Armache, K.-J. (2023) Catalytic and non-catalytic mechanisms of

- histone H4 lysine 20 methyltransferase SUV420H1, *bioRxiv*, doi: 10.1101/2023.03.17.533220.
65. Nicetto, D., and Zaret, K. S. (2019) Role of H3K9me3 heterochromatin in cell identity establishment and maintenance, *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **55**, 1-10, doi: 10.1016/j.gde.2019.04.013.
 66. Tachibana, M., Matsumura, Y., Fukuda, M., Kimura, H., and Shinkai, Y. (2008) G9a/GLP complexes independently mediate H3K9 and DNA methylation to silence transcription, *EMBO J.*, **27**, 2681-2690, doi: 10.1038/emboj.2008.192.
 67. Shah, S., and Henriksen, M. A. (2011) A novel disrupter of telomere silencing 1-like (DOT1L) interaction is required for signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1)-activated gene expression, *J. Biol. Chem.*, **286**, 41195-41204, doi: 10.1074/jbc.M111.284190.
 68. Song, Y., Wu, F., and Wu, J. (2016) Targeting histone methylation for cancer therapy: enzymes, inhibitors, biological activity and perspectives, *J. Hematol. Oncol.*, **9**, 49, doi: 10.1186/s13045-016-0279-9.
 69. Pokholok, D. K., Harbison, C. T., Levine, S., Cole, M., Hannett, N. M., Lee, T. I., Bell, G. W., Walker, K., Rolfe, P. A., Herbolzheimer, E., Zeitlinger, J., Liewitter, F., Gifford, D. K., and Young, R. A. (2005) Genome-wide map of nucleosome acetylation and methylation in yeast, *Cell*, **122**, 517-527, doi: 10.1016/j.cell.2005.06.026.
 70. Shi, B., Behrens, C., Vaghani, V., Riquelme, E. M., Rodriguez-Canales, J., Kadara, H., Lin, H., Lee, J., Liu, H., Wistuba, I., and Simon, G. (2019) Oncogenic enhancer of zeste homolog 2 is an actionable target in patients with non-small cell lung cancer, *Cancer Med.*, **8**, 6383-6392, doi: 10.1002/cam4.1855.
 71. Petrucci, L. A., Dupere-Richer, D., Pettersson, F., Retrouvey, H., Skoulikas, S., and Miller, W. H., Jr. (2011) Vorinostat induces reactive oxygen species and DNA damage in acute myeloid leukemia cells, *PLoS One*, **6**, e20987, doi: 10.1371/journal.pone.0020987.
 72. Attia, S. M., Al-Khalifa, M. K., Al-Hamamah, M. A., Alotaibi, M. R., Attia, M. S. M., Ahmad, S. F., Ansari, M. A., Nadeem, A., and Bakheet, S. A. (2020) Vorinostat is genotoxic and epigenotoxic in the mouse bone marrow cells at the human equivalent doses, *Toxicology*, **441**, 152507, doi: 10.1016/j.tox.2020.152507.

HISTONE METHYLTRANSFERASES AS A NEW TARGET FOR THE EPIGENETIC ACTION BY VORINOSTAT

V. P. Maksimova^{1#}, J. V. Makus^{1,2#}, V. G. Popova^{1,3}, A. Yu. Prus^{1,4}, O. G. Usalka^{1,5},
E. S. Trapeznikova⁵, E. M. Zhidkova¹, G. A. Belitsky¹,
M. G. Yakubovskaya¹, and K. I. Kirsanov^{1,2*}

¹ National Medical Research Center of Oncology named after N. N. Blokhin,
115478 Moscow, Russia; e-mail: kkirsanov85@yandex.ru

² Peoples' Friendship University of Russia, 117198 Moscow, Russia

³ Russian University of Chemical Technology named after D. I. Mendeleev, 125047 Moscow, Russia

⁴ MIREA – Russian Technological University, 119571 Moscow, Russia

⁵ I. M. Sechenov First Moscow State Medical University
of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), 119991 Moscow, Russia

Aberrant methylation and acetylation of histones are characteristic changes in the system of epigenetic regulation of gene expression accompanying the process of malignant transformation of the cell. Vorinostat is the epigenetic modulator that actively used in clinical oncology practice. The antitumor activity of vorinostat is considered to be associated with only with the inhibition of histone deacetylases. The effects of this drug on histone methylation have not been sufficiently studied. Using the HeLa TI test system, which allows evaluating the integral effect of epigenetically active compounds by activating the expression of the reporter gene GFP, and knockdown of genes by small interfering RNAs, we showed that the inhibitory effect of vorinostat is directed not only at HDAC1, but also at EZH2, SUV39H1, SUV39H2, SUV420H1. Using Western blotting, the ability of vorinostat to suppress the expression of enzymes EZH2, SUV39H1/2, SUV420H1 was confirmed and, in addition, its ability to inhibit the expression of enzymes SUV420H2 and DOT1L was revealed. The data obtained expand the understanding of the epigenetic effects of vorinostat and demonstrate the need for a large-scale analysis of its activity in relation to other epigenetic enzymes. A detailed understanding of the mechanism of epigenetic action of vorinostat will contribute to its more adequate use in the treatment of tumors with an aberrant epigenetic profile.

Keywords: malignant neoplasms with aberrant epigenetic profile, vorinostat, SAHA, histone methylation, histone methyltransferases (HMTs), HeLa TI test system, SUV39H1, SUV39H2, EZH2, SUV420H1, SUV420H2, DOT1L

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ МОДУЛЯЦИИ СТВОЛОВОСТИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ПРИ ФОРМИРОВАНИИ СФЕРОИДОВ: ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Обзор

© 2023 А.С. Пономарев, З.Е. Гилязиева, В.В. Соловьева, А.А. Ризванов*

*Казанский (Приволжский) федеральный университет,
420008 Казань, Республика Татарстан, Россия; электронная почта: rizvanov@gmail.com*

Поступила в редакцию 31.01.2023

После доработки 30.05.2023

Принята к публикации 07.06.2023

Опухолевые стволовые клетки (ОСК), их свойства и взаимодействие с микроокружением представляют интерес для современной медицины и биологии. Существует множество исследований возникновения ОСК и их вовлечённости в патогенез опухоли. Важнейшее свойство, присущее ОСК — это стволовость. Стволовость сочетает в себе способность клетки сохранять свою плюрипотентность, давать начало дифференцированным клеткам и взаимодействовать с окружающей средой для поддержания баланса между покоем, пролиферацией и регенерацией. В то время как взрослые стволовые клетки проявляют эти свойства, участвуя в гомеостазе тканей, ОСК ведут себя как их злокачественные эквиваленты. Высокая устойчивость опухоли к терапии, способность дифференцироваться, активировать ангиогенез и метастазирование возникает именно за счёт стволовости ОСК. Данные клетки могут использоваться в качестве мишени при терапии различных типов рака. Для изучения биологии рака и поиска новых терапевтических стратегий необходимы лабораторные модели. Перспективным направлением являются трёхмерные модели опухолей или сфероиды. В таких моделях формируются свойства, напоминающие стволовость в естественной опухоли. С помощью модификации сфероидов становится возможным исследовать влияние терапии на ОСК, тем самым способствуя развитию тест-систем противоопухолевых лекарственных средств. В обзоре рассматривается ниша ОСК, возможность их исследования с помощью использования трёхмерных сфероидов и существующие маркеры для оценки такого свойства ОСК, как стволовость.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: опухолевые стволовые клетки, стволовость, злокачественные новообразования, опухолевые сфероиды, микроокружение опухоли, факторы транскрипции, тест-система.

DOI: 10.31857/S0320972523070102, **EDN:** FXXZAF

ВВЕДЕНИЕ

Опухолевые стволовые клетки (ОСК) — небольшая субпопуляция опухолевых клеток [1–3], которая обладает свойствами стволовых клеток (СК) [4, 5]. СК и ОСК имеют сходства и различия. К сходствам можно отнести идентичность маркеров клеточной поверхности, а также способность к дифференцировке и самообновлению с помощью использования общих сигнальных путей [6]. Одним из различий между СК и ОСК является степень их за-

висимости от ниши, в которой они находятся. ОСК могут изменять свою нишу с помощью сигналов, стимулирующих пролиферацию, в отличие от СК. СК стабильны и содержат нормальный диплоидный геном, но ОСК являются анеуплоидными с хромосомными перестройками. Кроме того, СК, как правило, находятся в состоянии покоя и имеют относительно длинные теломеры, что нехарактерно для ОСК.

Наличие ОСК в опухолевой ткани обуславливает образование фенотипически различных

Принятые сокращения: МО — микроокружение опухоли; МСК — мезенхимные стволовые клетки; ОСК — опухолевые стволовые клетки; СК — стволовые клетки; ЭМП — эпителиально-мезенхимный переход; ALDH — альдегиддегидрогеназа; ЕpCAM — молекула адгезии эпителиальных клеток.

* Адресат для корреспонденции.

субклонов и приводит к дифференцированному клеточному составу опухоли [7]. Различие между ростом опухоли и обновлением ткани с участием СК заключается в дальнейшем пути развития транзитно-амплифицирующих клеток: обычно они дифференцируются и погибают, но в случае с опухолевыми клетками они накапливаются в организме и ускоряют опухолевый рост [8].

В отличие от дифференцированных опухолевых клеток, составляющих значительную часть опухоли и использующих гликолиз как способ получения энергии, ОСК обладают отчётливым метаболическим фенотипом, который, в зависимости от типа рака, может быть «гликолитическим» или присущим обычным клеткам — с сохранением окислительного фосфорилирования [9]. Отличием ОСК является онкогенная активность, позволяющая им образовывать опухоли при трансплантации лабораторным животным, что невозможно при трансплантации нормальных СК [10].

ОСК могут влиять на метаболизм соседних клеток, снабжать их питательными веществами и создавать благоприятные условия для роста опухоли. Наличие ОСК в микроокружении опухоли (МО) приводит к образованию гетерогенных клеточных популяций с высоким потенциалом пластичности [11, 12] и высокой устойчивостью к стрессовым факторам в МО (таких как низкий уровень кислорода или питательных веществ) [13, 14].

Доля ОСК в опухолевых тканях очень мала и обычно составляет не более 2% от общей массы опухоли. Для ОСК характерно наличие определённых маркеров, зависящих от типа ткани, в которой они располагаются (табл. 1). Около 73% поверхностных маркеров ОСК присутствует на мембранах эмбриональных клеток или СК взрослого организма и редко экспрессируется на мембранах дифференцированных клеток [15]. Показано, что лейкозные СК обладают фенотипом $CD34^+CD38^-$, отсутствие $CD38$ отличает эти клетки от нормальных гемопоэтических СК (ГСК) [16]. Singh et al. показали присутствие $CD133^+$ ОСК в опухолях глиобластомы [17], которые имеют устойчивость к химиотерапевтическому агенту темозоломиду, в отличие от $CD133^-$ клеток [18].

Кроме того, маркерами ОСК могут являться не только поверхностные антигены, но и микроРНК (miR-21, miR-210, miR-34a, miR-16 и др.) [45].

Стволовость относится к общим молекулярным процессам, лежащим в основе свойств самообновления СК и генерации дифференцированного потомства. Стволовость позволяет поддерживать популяцию клеток и баланс между покоем, пролиферацией и регенерацией [46]. Известно, что стволовость опухолевых клеток проявляется в сохранении наследственности, способности переживать стресс и влияние химиотерапевтических препаратов и является ключевым признаком прогрессирования

Таблица 1. Специфические маркеры ОСК для различных типов онкологических заболеваний

Маркеры ОСК	Орган	Литература
$CD133^+$, $CD49f^+$, $CD90^+$, рецептор эпидермального фактора роста (EGFR ⁺), нейронспецифический антиген A2B5 ⁺ , молекула адгезии клеток L1 (L1CAM ⁺)	головной мозг	[19–23]
$CD133^+$, $CD24^+$, альдегиддегидрогеназа (ALDH ⁺), $CD44^+$ / $CD117^+$, молекула адгезии эпителиальных клеток (EPCAM ⁺)	яичники	[19, 24–26]
$CD133^+$, EPCAM ⁺ , $CD117^+$, $\alpha2\beta1^+$, ALDH ⁺ , $CD44^+$, гистон-лизин-N-метилтрансфераза EZH2 ⁺ , C-X-C хемокиновый рецептор 4 типа (CXCR4 ⁺), E-кадгерин (ECAD ⁺)	предстательная железа	[19, 27–29]
$CD133^+$, $CD44^+$, $CD166^+$, $CD24^+$, EPCAM ⁺	толстая кишка	[19, 30, 31]
$CD133^+$, $CD44^+$, $CD24^+$, EPCAM ⁺ , тирозин-протеинкиназа cMet ⁺	поджелудочная железа	[19, 32–34]
$CD44^+$, $CD90^+$, $CD206^+$, антиген OV-6 ⁺	печень	[19, 35–37]
$CD20^+$, $CD271^+$, ALDH ^{+, $CD133^+$}	кожа	[19, 38, 39]
$CD133^+$, АТФ-связывающий кассетный транспортёр ABCG2 ^{high} , $CD166^+$, $CD90^+$, $CD87^+$, ALDH ^{+, $CD44^+$}	лёгкие	[19, 40–42]
ALDH1 ⁺ , $CD24^+$, $CD44^+$, $CD90^+$, $CD133^+$, $\alpha6$ -интегрин ⁺	молочная железа	[19, 43, 44]

онкологического заболевания [47, 48]. Было показано, что CD133⁺ СК карциномы толстой кишки обладают устойчивостью к фторурацилу и оксалиплатину, в отличие от CD133⁻ клеток [49].

Понимание генетических и эпигенетических изменений в опухолевых клетках, превращающихся в стволовые, является ключом к разработке новых терапевтических подходов. Расширить знания о патофизиологии ОСК в опухоли могут качественные модельные системы, позволяющие получить прикладную информацию о молекулярных свойствах злокачественной опухоли [46]. Ксенотрансплантаты хорошо зарекомендовали себя в качестве модели для изучения устойчивости ОСК. Например, ксенотрансплантаты, полученные из опухолевой ткани поджелудочной железы пациентов и обработанные гемцитабином, проявляли устойчивость к терапевтическому агенту благодаря ОСК [50]. При Т-клеточном остром лимфобластном лейкозе ксенотрансплантаты имели более сильное генетическое сходство с образцами рецидива, чем с основной опухолью на момент постановки диагноза, что может означать естественный отбор резистентных клонов при ксенотрансплантации [51].

На сегодняшний день пробелы в изучении стволовости опухолевых клеток ставят перед исследователями задачу ответить на ряд вопросов, которые включают в себя следующие: насколько различны между собой СК опухолевой и нормальной ткани, будут ли происходить изменения стволовости при длительном течении заболевания, есть ли различия стволовости между типами опухолей одной ткани и как можно использовать это свойство для целей биологии и медицины [52].

ТРАНСКРИПЦИОННЫЕ ФАКТОРЫ И СИГНАЛЬНЫЕ ПУТИ СТВОЛОВОСТИ

Нарушение регуляции экспрессии и активности факторов транскрипции в опухоли позволяет раковой клетке приобретать стволовость, выражающуюся в способности к самообновлению, дифференцировке и образованию опухолей *in vivo*. Такие ОСК обладают значительным потенциалом метастазирования и устойчивости к терапии, для объяснения которых требуется глубокое понимание молекулярных механизмов изменения транскрипционных факторов, ассоциированных со стволовостью. К основным транскрипционным факторам, играющим ключевую роль в регуляции роста ОСК, относятся OCT4, SOX2, NANOG, KLF4 и MYC [53].

OCT4 контролирует самообновление и поддерживает плюрипотентность СК [54]. Сверхэкспрессия гена *OCT4* описана при некоторых типах онкологических заболеваний и способствует самообновлению СК и развитию лекарственной устойчивости [55, 56]. Нокдаун *OCT4* снижает стволовость опухолевых клеток [57]. Установлена корреляция между экспрессией *OCT4* и метастазированием колоректального рака в печень. Например, Fujino et al. исследовали клинические образцы и OCT4⁺ клетки колоректальной аденокарциномы. Уровень экспрессии *OCT4* коррелировал с частотой метастазирования в печень у пациентов, а OCT4⁺ клетки обладали способностью к самообновлению и дифференцировке аналогично ОСК [58]. Экспрессия *OCT4* клетками рака лёгких приводит к поляризации M2 макрофагов, индуцируя секрецию макрофагального колониестимулирующего фактора (M-CSF), что, в свою очередь, способствует росту опухоли и метастазированию [59].

SOX2 играет роль в развитии и поддержании стабильности недифференцированных эмбриональных СК (ЭСК), выполняет ключевые функции в регуляции пролиферации, самообновлении и в других процессах в СК, а также участвует в развитии стволовости опухолевых клеток [60, 61]. При трижды негативном раке молочной железы установлена сверхэкспрессия гена *SOX2*. Подавление экспрессии *SOX2* приводило к снижению пролиферации клеток трижды негативного рака молочной железы, подавлению способности клеток к инвазии, индукции апоптоза *in vitro* и снижению роста и метастазирования опухоли *in vivo* [62]. На ксенографтной модели мышей с остеосаркомой показано, что специфический для остеобластов условный нокаут *SOX2* вызывает резкое снижение частоты возникновения опухолей. Все вновь возникшие редкие опухоли, обнаруженные у подопытных животных с нокаутом *SOX2*, были *SOX2*-позитивными, что указывает на то, что они возникли из клеток, избежавших делеции *SOX2* [63]. При исследовании пациентов на поздних стадиях рака толстой и прямой кишки, желудка, яичников, а также меланомы было обнаружено, что коэкспрессия CD133 и *SOX2* связана с худшим прогнозом выживаемости [64].

NANOG является ключевым фактором для поддержания плюрипотентности и процесса самообновления ЭСК [65] и часто сверхэкспрессируется при многих типах онкологических заболеваний [66, 67]. При плоскоклеточном раке полости рта установлено повышение экспрессии NANOG с увеличением степени

Таблица 2. Влияние сигнальных путей на развитие онкологических заболеваний

Название сигнального пути	Функция	Активация в опухолевых клетках	Ссылки
Wnt/ β -катенин	регулирует эмбриогенез и дифференцировку клеток	молочной железы, толстой кишки, пищевода	[84–90]
Notch	один из наиболее важных сигнальных путей поддержания стабильности и функционирования СК	молочной железы, желудка, поджелудочной железы, толстой кишки и гематологических злокачественных новообразований	[91–93]
Hedgehog	участвует в эмбриональном развитии, формировании различных систем организма, включая нервную систему, а также такие органы, как лёгкие, сердце и кишечник	лёгкого, молочной железы, кожи, головного мозга, печени, желчного пузыря, поджелудочной железы, желудка, толстой кишки, простаты и гематологических злокачественных новообразований	[94–99]
NF- κ B	участвует в выживании, пролиферации и дифференцировке клеток	желудочно-кишечного тракта, мочеполовой системы, головы и шеи, молочной железы	[100–102]
JAK/STAT	способствует выживанию, самообновлению, гематопоезу и нейрогенезу ЭСК	лёгких, толстой кишки, печени	[103–109]
PI3K/AKT/mTOR	важен для пролиферации и выживания клеток	молочной железы, лёгких, толстой кишки, костного мозга	[110–115]

Таблица 3. Белки и ферменты, участвующие в поддержании стволовости ОСК

Название	Роль	Ссылка
Галектин-3	играет роль в пролиферации клеток, динамической трансформации клеток, миграции и инвазии, выживании и апоптозе	[116]
Куллин 4В (CUL4B)	стимулирует развитие и метастазирование рака толстой кишки	[117]
Лизиндеметилаза 3А (KDM3A)	является критическим регулятором стволовости рака яичников и устойчивости к цисплатину	[118]
Фарнезилдифосфатсинтаза (FDPS)	играет важную роль в поддержании стволовости глиобластомы	[119]

дисплазии, что может являться ранним предиктором риска развития злокачественного новообразования [68]. Показано, что экспрессия гена *NANOG* связана с повышенной активностью ALDH и клеточной радиорезистентностью (посредством активации сигнальных путей NOTCH1 и AKT), а также со стимулированием репарации двухцепочечных разрывов ДНК [69]. Доказано, что мутации в гене *SPOP* приводят к отмене SPOP-опосредованной деградации NANOG, тем самым вызывая увеличение синтеза маркеров СК опухолевыми клетками простаты и снижая выживаемость пациентов [70].

KLF4 играет важную роль в регуляции пролиферации, дифференцировки, апоптоза и репрограммирования соматических клеток [71]. KLF4 активирует экспрессию теломеразы обратной транскриптазы (TERT) и способствует поддержанию плюрипотентности и самообновления ЭСК [72]. KLF4 может играть двойственную роль в канцерогенезе, либо стимулируя данный процесс, либо функционируя как онкосупрессор. Установлена сверхэкспрессия гена *KLF4* при разных типах меланом человека. Эктопическая экспрессия *KLF4* усиливает скорость деления клеток меланомы за счёт ингибирования апоптоза. Напротив, нокдаун

Таблица 4. Клинические испытания новых противоопухолевых стратегий терапии онкологических заболеваний, направленных на опухолевые СК

Тип рака	Описание испытания	Идентификатор ClinicalTrials.gov
Глиобластома	открытое рандомизированное исследование II/III фазы иммунотерапии дендритными клетками против ОСК у пациентов с глиобластомой, получающих стандартную терапию	NCT03548571
Аденокарцинома лёгкого, печени, поджелудочной железы	рандомизированное исследование, основной целью которого является определение безопасности иммунизации вакциной из ОСК	NCT02084823 NCT02089919 NCT02074046
Эпителиальный рак яичников, маточной трубы или брюшной полости	рандомизированное контролируемое клиническое исследование для определения сочетания препаратов с помощью анализа ChemoID (тест измеряет цитотоксический эффект препаратов и выявляет наиболее эффективный препарат, который может воздействовать на ОСК)	NCT03632798
Рак молочной железы	рандомизированное исследование II фазы, целью которого является оценка активности бевацизумаба в сочетании с традиционной химиотерапией против ОСК	NCT01190345
Карциномы, саркомы (лёгкого, пищевода, тимуса) или новообразования зародышевых клеток с плевропульмональными метастазами	нерандомизированное исследование I/II фазы, которое изучает влияние препарата-ингибитора передачи сигналов ОСК	NCT02859415
Рецидивирующая глиобластома	испытания I фазы, целью которых является изучение активированных аутологичных Т-клеток против антигенов ОСК	NCT05341947

KLF4 снижает пролиферацию клеток меланомы и вызывает гибель клеток. Кроме того, истощение запаса *KLF4* снижает скорость роста ксенотрансплантата меланомы *in vivo* [73]. *KLF4* играет важную роль в регуляции стволовости клеток остеосаркомы, а сигнальный путь *KLF4*—p38 MAPK может стать потенциальной терапевтической мишенью для лечения остеосаркомы [74]. Было установлено, что нокдаун *KLF4* способствует миграции и инвазии клеток немелкоклеточного рака лёгкого. При восстановлении экспрессии *KLF4* отмечено снижение инвазии опухолевых клеток [75]. Аналогично, в генетически модифицированных клетках рака яичников, трансдуцированных лентивирусом для сверхэкспрессии *KLF4*, наблюдалась повышенная чувствительность клеток к действию паклитаксела и цисплатина [76].

Белки MYC (с-Мус, L-Мус, S-Мус и N-Мус) представляют собой семейство факторов транскрипции, которые регулируют рост, дифференцировку, самообновление, метаболизм и клеточный цикл СК [77]. В опухолях человека часто наблюдается сверхэкспрессия *MYC* по сравнению с нормальной тканью. Нару-

шение регуляции *MYC* играет важную роль в поддержании количества инвазивных ОСК. Было установлено, что сверхэкспрессия *MYC* в ОСК глиобластомы индуцирует пролиферацию и инвазию опухолевых клеток и ингибирует апоптоз [78]. Показано, что нарушение регуляции *MYC*, включающей увеличение экспрессии этого гена, приводит к развитию инвазивной протоковой карциномы [79]. Примечательно, что с-MYC активирует экспрессию *SOX4* посредством связывания с его промотором, таким образом, сверхэкспрессия с-MYC может способствовать прогрессированию рака простаты путём активации *SOX4* [80].

Всё больше данных свидетельствует о том, что выживанию ОСК может способствовать чрезмерно активная или аномальная сигнализация между сигнальными путями. Установлено, что при злокачественных новообразованиях происходит нарушение регуляции сигнальных путей Wnt, NF-κB, Notch, Hedgehog, JAK/STAT и PI3K/AKT/mTOR, которые играют важную роль в поддержании стволовости ОСК (табл. 2) [53]. Более того, белки вышеуказанных сигнальных путей участвуют

в миграции, развитии/поддержании резистентности и образовании опухоли, а также в эпителиально-мезенхимном (ЭМП) и мезенхимно-эпителиальном (МЭП) переходах [81]. Гены различных сигнальных путей могут экспрессироваться на разных этапах канцерогенеза в разных типах опухолей, а также иметь перекрёстное взаимодействие в регуляции ОСК [82]. Таким образом, сигнальные пути, регулирующие пролиферацию ОСК, представляют собой сложные сети сигнальных медиаторов, взаимодействующих друг с другом [83]. Также существует достаточно большое количество дополнительных молекулярных агентов, влияющих на стволовость ОСК (табл. 3).

Таким образом, исследование факторов транскрипции и сигнальных путей обеспечивает не только развитие научных знаний в области биологии СК, но и вносит значительный вклад в применение данных знаний при создании новых терапевтических стратегий (табл. 4). Большое количество исследований направлено на создание таргетной терапии с использованием компонентов сигнальных путей в качестве мишеней. Фундаментальным является понимание связей, возникающих из-за стволовых свойств опухоли, между различными подтипами рака молочной железы, поскольку это позволит определить потенциальные терапевтические подходы. В работе Mei et al. разницу между подтипами клеток определяли с использованием системы CRISPR/dCas9, направленной на гены *OCT4*, *KLF*, *MYC* и *SOX2*. Использование такого метода позволило определить, что клетки, синтезирующие рецептор эпидермального фактора роста 2 (HER2), являются предшественниками люминальных А-клеток, следовательно, для терапии, направленной на данные опухолевые клетки, могут быть применены схожие противоопухолевые препараты [120].

СТВОЛОВОСТЬ И МИКРООКРУЖЕНИЕ ОПУХОЛИ

СК не могут выживать вне своей ниши и в отсутствие специфических факторов микроокружения [121]. Известно, что внешние стимулы могут способствовать появлению новых СК, поскольку клетки в целом сохраняют способность дедифференцироваться [122]. Воздействие внеклеточных факторов микроокружения, таких как мезенхимные СК (МСК), иммунные клетки, опухоль-ассоциированные фибробласты (ОАФ), внеклеточный матрикс (ВКМ), везикулы и гипоксия, способствует приобретению стволовости опухолевыми клет-

ками или их репрограммированию в ОСК [53]. Сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF) способствует приобретению клетками фенотипа опухолевой стволовости при плоскоклеточном раке кожи [123]. При плоскоклеточной карциноме головы и шеи эпидермальный фактор роста (EGF), секретируемый эндотелиальными клетками, индуцирует ЭМП с приобретением клетками характеристик СК [124]. Трансформирующий фактор роста (TGF)- β , секретируемый ОАФ, способствует ЭМП и увеличению пролиферации и метастазирования клеток рака молочной железы [125].

Гипоксия также воздействует на стволовость и другие свойства опухолевых клеток благодаря увеличению синтеза фактора, индуцируемого гипоксией (HIF)-1 α [126, 127].

Интересным представляется влияние белков ВКМ на модуляцию стволовости. Например, в работе Zhang et al. был исследован фибриновый гель, который использовался для создания трёхмерного (3D) ВКМ клеток рака толстой кишки. Мягкий фибриновый гель (90 Pascal) был наиболее эффективным для обогащения опухолевых колоний. В частности, эти опухолевые колонии проявляли канцерогенность, активировали маркеры СК и обладали анти-химиотерапевтическими свойствами. Данные структуры были названы репопулирующими опухоль клетками (РОК). Следует отметить, что в 3D-культивируемых РОК толстой кишки индуцировался фактор NANOG [128]. Также известно, что коллаген I типа (Col-I) вызывает стволовость опухоли. В работе Valadão et al. была определена зависимость этого эффекта от плотности Col-I. Результаты показали, что высокая плотность Col-I увеличивала количество CD44⁺CD24 СК рака молочной железы, но не способствовала самообновлению и клоногенности клеток. Таким образом, был сделан вывод, что высокая плотность Col-I сама по себе недостаточна для полного развития фенотипа СК рака молочной железы [129].

Факторы, связанные с воспалением, могут активировать сеть репрограммирования, ведущую к генерации ОСК. Установлено, что уровень IL-6 в сыворотке крови был выше у пациентов с остеосаркомой, чем в контрольной группе. IL-6 также увеличивал пролиферацию и сферообразование клеток остеосаркомы, а также усиливал их инвазивный и миграционный потенциал, способствуя, таким образом, образованию клеток с ЭМП-подобным фенотипом и повышенной химиорезистентностью. На ксенографтной модели остеосаркомы было определено, что размер и вес опухоли был выше у мышей, получавших рекомбинантный IL-6,

чем у контрольных [130]. Было обнаружено, что IL-1 β может индуцировать сферообразование клеток рака толстой кишки, которые характеризовались активацией генов факторов стволовости (*BMI1* и *NESTIN*) и повышенной лекарственной устойчивостью, что является отличительной чертой ОСК [131]. Hong et al. показали, что фактор некроза опухоли (TNF)- α способствует канцерогенезу опухолей полости рта, связанному с вирусом папилломы человека, за счёт увеличения стволовости клеток опухоли [132].

Внеклеточные везикулы (ВВ) опухолевых и стромальных клеток опосредуют межклеточную коммуникацию в МО и участвуют в различных стадиях канцерогенеза, таких как пролиферация, ангиогенез, метастазирование и формирование устойчивости к терапевтическим препаратам. Из-за того, что ВВ переносят в себе различные вещества, они могут участвовать в межклеточной коммуникации и играть роль в приобретении клетками стволовости. Например, ВВ, продуцируемые СК глиобластомы, способствуют образованию эндотелиальной трубки [133]. Аналогично, при колоректальной аденокарциноме экзосомы ОАФ способствовали увеличению процента ОСК в опухоли, активируя сигнальный путь Wnt [134]. ВВ из МСК могут иметь двойное действие: они могут усиливать рост и метастазирование опухоли или же способствовать апоптозу клеток и вызывать регрессию опухоли [135, 136].

Таким образом, выделяемые МО внеклеточные факторы влияют на стволовость и гетерогенность клеток посредством регуляции сигнальных путей.

СФЕРОИДЫ КАК МОДЕЛЬНАЯ СИСТЕМА ИЗУЧЕНИЯ ОСК

На сегодняшний день представляет интерес использование 3D-моделей в исследованиях опухолей. Одной из таких моделей является опухолевый сфероид. Сфероиды можно разделить на несколько типов: (I) многоклеточный сфероид, впервые описанный в начале 70-х гг. и полученный путём культивирования линий опухолевых клеток на неадгезивной культуральной посуде; (II) онкосфера — модель экспансии ОСК в бессывороточной среде с добавлением факторов роста; (III) органотипический многоклеточный сфероид, полученный путём механической и ферментативной диссоциации опухолевой ткани [137].

Многоклеточные сфероиды используются в качестве модельной системы *in vitro* для ис-

следований микрометастазов и аваскулярных опухолевых регионов. Кроме того, такой тип сфероидов подходит для изучения устойчивости опухоли, зависимой от клеточной адгезии.

Термины «сфера», «опухолевая сфера» [138] и «онкосфера» [139] используются для описания сфер, полученных из ОСК. С данной моделью обычно проводят исследования для оценки и характеристики ОСК *in vitro* [140]. Примечательно, что названия сфер могут происходить от типа ткани, из которой они образованы. Например, сферы культур СК головного мозга и молочной железы были названы «нейросферы» [141] и «маммосферы» [142].

Органотипические многоклеточные сфероиды предназначены для точного воспроизведения МО. В таких сфероидедах опухолевые клетки окружены неопухолевыми клетками и стромальными компонентами, которые обычно обнаруживаются в МО [140].

В литературе данные модели ставят между 2D- и ксенографтными моделями, предполагая, что 3D-модели смогут заполнить те пробелы, которые существуют между ними [140]. 3D-модели характеризуются высокой транслируемостью биологических характеристик исходных опухолей, что даёт преимущества при их использовании [143]. 3D-модели обладают архитектурой и метаболическими реакциями, схожими с таковыми для нативной опухоли. Гистоморфологический анализ показывает, что 3D-модель, в частности, опухолевый сфероид, разделяется на несколько зон, как и естественная опухоль. К ним относятся: внешняя зона, характеризующаяся преимущественно пролиферирующими клетками, средняя зона с покоящимися клетками и центральная некротическая часть [144]. Образование некротической зоны можно объяснить недостаточной оксигенацией, отсутствием питательных веществ и накоплением метаболитов. Внешняя часть сфероида характеризуется большим количеством лактата и минимальным количеством АТФ, преимущественно из-за значительного потребления пролиферирующим слоем клеток. Распределение глюкозы происходит равномерно во всех зонах сфероида [145].

Перечисленные типы опухолевого сфероида могут содержать различные клетки, поддерживая генетическую гетерогенность и взаимодействие опухолевых клеток и стромы. С помощью 3D-моделей открывается возможность исследовать межклеточные контакты, микроокружение и взаимодействие иммунных и опухолевых клеток [146]. При проведении экспериментов с 3D-культурой клеток можно получить более точные данные о действии

терапевтических средств, метаболическом профилировании, свойствах СК [147] и таких процессов, как ЭМП и МЭП, которые вовлечены в регуляцию стволовости. Активация нескольких факторов транскрипции, включая *SNAI1* и *SNAI2*, на молекулярном уровне обуславливает эффект ЭМП. Этот эффект связан с потерей молекул, обеспечивающих межклеточные контакты, таких как *ECAD*, а также приобретением мезенхимных маркеров, включая виментин. ЭМП был особенно хорошо изучен на примере различных типов опухолевых сфероидов, а также на нормальных СК, включая кардiosферы, нейросферы и сферы сетчатки. Дополнительно исследования активации ЭМП были проведены на ЭСК (бластуляция), эмбрионидных тельцах и клетках, подвергнутых индуцированному перепрограммированию [148].

Опухолевые сфероиды можно получить агрегацией или спонтанной самосборкой. Агрегация может быть вызвана принудительным контактом клетки с клеткой различными методами, такими как «висячая капля», клеточная суспензия, микролунка (96-луночные планшеты с круглым дном) или микрогидродинамика (т.е. инкапсуляция в геле) [140].

Исследования модельных систем сфероидов с использованием новых специфичных агентов, нацеленных на сигнальные пути стволовости *Notch* (МК-0752, R4733 и TR-4) [113], *PI3K* (CAL-101 и XL-147) [114], *AKT* (перифозин и архексин) [149] и *Hedgehog* (BMS-863923 и IPI-926), представляют большой интерес для развития противоопухолевой терапии [150]. Установлено, что салиномицин (ионофорный полиэфирный антибиотик) способен избирательно убивать ОСК молочной железы и индуцировать эпителиальную дифференцировку опухолевых клеток, способствуя элиминированию опухоли [138]. Namiki et al. показали, что галлат эпигаллокатехина, одно из важнейших органических веществ зелёного чая, снижает стволовость и онкогенность клеток рака лёгких человека, ингибируя рецепторы *AXL* [151].

Существенным препятствием для разработки рациональных методов терапии онкологических заболеваний является несоответствие между модельными системами и организмом пациента. Чтобы решить эту проблему, Fendler et al. использовали ОСК для создания опухолевых сфероидов, трёхмерных органоидов опухоли и ксенотрансплантатов светлоклеточного почечно-клеточного рака. Лечение ингибиторами сигнальных путей *Wnt* и *Notch* блокировало пролиферацию и самообновление ОСК в сфероидах и органоидах и замедляло рост

опухоли в ксенотрансплантатах, полученных от пациентов, у мышей [152].

Таким образом, использование данных модельных систем расширяет возможности для создания скрининговой платформы для тестирования лекарственных препаратов. Кроме того, использование 3D-моделей открывает перспективы для развития персонализированной медицины. А изучение ОСК раскрывает молекулярные механизмы их функционирования и способствует поиску терапевтической мишени для инновационных методов лечения, направленных на уничтожение ОСК.

ОБОГАЩЕНИЕ ПОПУЛЯЦИИ ОСК В СФЕРОИДАХ

Одним из методов, обычно используемых для идентификации ОСК и изучения их свойств *in vitro*, является анализ сферообразования. Сферообразующие клетки представляют собой СК. Нужно отметить, что в литературе для данного метода анализа ОСК употребляются названия как «сфера», так и «сфероид». Сфероиды задействованы в исследованиях стволовости рака *in vitro* и рассматриваются как один из критериев подтверждения наличия ОСК [153]. Например, Qureshi-Baig et al. культивировали сфероиды, полученные из клинических образцов колоректальной карциномы. Показано, что данные сфероиды фенотипически напоминают нативную опухоль, сохраняют несколько сходных мутаций, относящихся к колоректальному раку, и экспрессируют гены *SOX2*, *OCT4* и *NANOG*. После проведения сравнения сфероидов ткани и клеточных линий обнаружилось, что оба типа сфероидов проявляли аналогичную способность к самообновлению и одинаково формировали опухоли у мышей с иммунодефицитом [154]. Также были охарактеризованы ОСК яичников человека, которые демонстрировали повышенную химиорезистентность к цисплатину и паклитакселу и экспрессию генов СК (*NOTCH-1*, *NANOG*, *NES*, *ABCG2* и *OCT4*) [155].

Существует достаточно большое количество исследований ОСК, связанных с использованием сфероидов. Например, объединение математического моделирования и секвенирования РНК сфероидов опухоли яичников, образованных методом «висячая капля», позволяет выявлять гены, ассоциированные с появлением ОСК и поддерживающие химиорезистентность и злокачественный фенотип. Было показано возникновение популяций ОСК в сфероидах [156]. Bahmad et al. описали протоколы

и перечень необходимых реагентов для создания сфероидов опухоли простаты и различные манипуляции с ними [157]. Показано, что сфероиды опухоли простаты выдержали более 30 пассажей без заметной потери стволовости. Сфероиды пролиферировали медленнее со значительным снижением активации сигнального пути PI3K/AKT по сравнению с монослойными клетками линии DU145 [158].

На обогащение популяции ОСК в сфероидов могут влиять различные факторы, которые можно использовать в исследованиях. Например, условия бессывороточного культивирования используются для обогащения сфероидов СК. Herheliuk et al. показали возможность обогащения ОСК популяции клеток опухоли (в данном случае мультиклеточных опухолевых сфероидов (МОС)). Стандартизация протоколов культивирования обогащённых МОС (оМОС) может предоставить возможность использовать данные культуры для идентификации лекарств, которые могут подавлять пролиферацию ОСК. Для обогащения сфероидов ОСК использовалась бессывороточная среда с добавлением фактора роста фибробластов (FGF), EGF, инсулина и гидрокортизона. Наибольшая экспрессия рецепторов CD133, CD44, CD24 и BMI-1 была обнаружена в оМОС. оМОС были менее чувствительны к противоопухолевым препаратам (цисплатин, метотрексат и доксорубин), чем адгезивные культуры клеток и МОС, культивируемые в стандартных условиях в полной питательной среде [159].

Аналогично, клеточные линии гепатомы человека PLC/PRF/5 и HepG2 были выращены в условиях, используемых для ОСК. Среда для культивирования включала бессывороточную среду DMEM/F12 с добавлением 100 МЕ/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 20 нг/мл рекомбинантного EGF человека, 10 нг/мл рекомбинантного основного FGF человека и добавок B27 и N-2. Затем клетки культивировали в 6-луночных неадгезивных планшетах при плотности не более 5000 клеток/лунку. В результате сферообразующие клетки PLC/PRF/5 проявляли свойства ОСК: самообновление, обширная пролиферация, лекарственная устойчивость, а также сверхэкспрессия OCT3/4, OV6, EpCAM, CD133 и CD44. Даже небольшое количество клеток было способно образовывать опухоли у иммунодефицитных мышей и не терять данное свойство при многократном пассировании сфероидов [160]. Также обнаружено, что изменение компонентов среды может играть роль в стволовом фенотипе клеток. Maliszewska-Olejniczak et al. показали, что добавление среды без ксенона или

с низким содержанием сыворотки к 3D-культуре карциномы почки увеличивало экспрессию генов, кодирующих факторы стволовости, включая *ECAD*, ген N-кадгерина (*NCAD*), *VEGF*, *SOX2*, *PAX2* и *NESTIN* [161].

Различные матриксы могут влиять на повышение количества ОСК в сфероидах. Например, культивирование клеток MCF-7 на коллагеновых матриксах увеличивало пролиферацию клеток и генерировало популяцию со свойствами ОСК [162]. Кроме того, малые богатые лейцином протеоглики ВКМ могут играть роль в регулировании сигнальных путей, устойчивости к лекарствам и пластичности ОСК-подобных клеток [163]. Также показано, что агар, который может применяться для создания неадгезивных условий при генерации сфероидов, может играть роль в обогащении их ОСК. Это подтверждается увеличением экспрессии маркеров ОСК, присутствием CD133⁺/CD44⁺ или SORE6⁺ клеток и повышенной способностью к самообновлению и канцерогенезу *in vivo* [164]. Такое же покрытие (агар) использовалось для культивирования сфероидов из клеток плоскоклеточного рака полости рта и показало экспрессию маркеров СК и проявление химиорадиотерапевтической резистентности в дополнение к способности инициировать опухоль и самообновляться [165]. Кроме того, такие добавки, как метилцеллюлоза и желатиновая камедь, были использованы для создания новой системы культивирования на основе традиционной. Разработанная система культивирования предлагает привлекательный альтернативный метод для усиления ОСК *in vitro* с потенциалом обширного использования в исследованиях ОСК и скрининге лекарств [166].

Для создания сфероидов с повышенным потенциалом ОСК можно применить метод клонирования одной клетки. Так, Muenzner et al. создали одноклеточные клоны HepG2, которые сформировали 3D-кластеры клеток после 8 дней инкубации и были по отдельности перенесены в лунки 12-луночного планшета для культивирования клеток. Было показано, что клон № 5 проявляет более высокоагрессивные и инвазивные характеристики, связанные, скорее всего, со значительно более высокой экспрессией клинически значимых маркеров СК и более мезенхимным фенотипом. Кроме того, более высокий метастатический потенциал был обнаружен для клеток клона № 5 по сравнению с родительской линией клеток HepG2 *in vivo* с помощью флуоресцентной визуализации. Таким образом, обогащённые ОСК клоны HepG2, безусловно, представляют собой подходящие модельные системы для изучения

роли ОСК во время инициации, прогрессирования и формирования лекарственной устойчивости гепатоклеточной карциномы [167].

Интересно, что изучение влияния МСК на опухоль можно проводить при создании гибридов с клетками рака желудка с помощью полиэтиленгликоля (PEG) *in vitro*. Такие гибриды характеризовались изменением ЭМП с пониженной регуляцией ECAD и повышенной регуляцией виментина, NCAD, α -гладкомышечного актина (α -SMA) и белка активации фибробластов (FAP). У гибридов была повышена экспрессия транскрипционных факторов стволовости — генов *OCT4*, *NANOG*, *SOX2* и *LIN28*. Экспрессия CD44 и CD133 на гибридных клетках была выше, чем на родительских клетках рака желудка. Отмечено усиление миграционных свойств и деления гибридных клеток. Кроме того, гетеротипические гибриды способствовали росту опухоли ксенотрансплантата желудка *in vivo*. Предположительно, слияние МСК и клеток рака желудка способствует образованию онкогенных гибридов с ЭМП и свойствами СК, что может предоставить возможность для исследования роли МСК при раке желудка [168].

Таким образом, основной особенностью сфероидов, полученных из опухоли, является обогащение их ОСК или клетками с характеристиками, связанными с СК. Поскольку эрадикация ОСК, вероятно, будет иметь клиническое значение из-за их связи со злокачественной природой опухолевых клеток, такой как канцерогенность или химиорезистентность, исследование сфероидов, полученных из опухоли, может дать неоценимые подсказки для борьбы с онкологическими заболеваниями. Сфероиды, полученные из опухоли, могут оказаться полезными для обнаружения новых маркеров ОСК, стать удобной моделью для более качественной оценки реакции опухолевых клеток на лекарства, пролиферации и морфологии клеток [161, 169]. Кроме того, повышение уровня стволовости сфероидов может способствовать улучшению скрининговой платформы противоопухолевых терапевтических средств, созданию новой таргетной терапии и изучению биологии ОСК.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

За последние десятилетия выживаемость пациентов со злокачественными новообразованиями значительно увеличилась благодаря развитию новых технологий противоопухоле-

вой терапии, которые включают применение улучшенных химиотерапевтических препаратов и таргетную терапию. Тем не менее терапия поздних стадий рака осложняется из-за высокой клеточной гетерогенности, обусловленной генетическими мутациями, опухолевой стромой и наличием ОСК, ангиогенности и метастазирования опухоли. В МО ОСК посредством активации различных сигнальных путей поддерживают рост опухоли, опосредуя поступление питательных веществ и метаболитов. С помощью пластичности и самообновления ОСК образуют группу резистентных клонов, тем самым способствуя развитию лекарственной устойчивости и метастазированию опухоли. Таким образом, ОСК являются важной терапевтической мишенью при создании новых противоопухолевых стратегий лечения. Лучшее понимание биологии ОСК и их взаимодействия с микроокружением позволит значительно продвинуться в борьбе с прогрессированием опухоли, рецидивами и резистентностью к терапии. Лимитирующим фактором в разработках эффективных методов терапии является структурная сложность опухоли, которую тяжело перенести на модельные системы *in vitro*. Моделирование МО особенно сложно, и поэтому использование 3D-моделей может улучшить селекцию лекарственных кандидатов на этапе их разработки. Одной из таких моделей являются сфероиды, представляющие большой интерес благодаря возможности воссоздавать патогенез опухоли с помощью гибкой модификации. Использование сфероидов для изучения ОСК позволит усилить прогностический потенциал онкологических исследований и предоставить новые возможности для терапии онкологических заболеваний.

Вклад авторов. В.В. Соловьева, Р.Р. Ризванов — концепция и руководство работой; А.С. Пономарев, З.Е. Гилязиева — написание текста и редактирование текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена за счёт средств Российского научного фонда (грант № 21-74-10021).

Благодарности. Работа выполнена при поддержке Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Wei, R., Liu, S., Zhang, S., Min, L., and Zhu, S. (2020) Cellular and extracellular components in tumor microenvironment and their application in early diagnosis of cancers, *Anal. Cell Pathol. (Amst)*, **2020**, 6283796, doi: 10.1155/2020/6283796.
- Bozyk, A., Wojas-Krawczyk, K., Krawczyk, P., and Milanowski, J. (2022) Tumor microenvironment – a short review of cellular and interaction diversity, *Biology (Basel)*, **11**, 929, doi: 10.3390/biology11060929.
- Ribeiro Franco, P. I., Rodrigues, A. P., de Menezes, L. B., and Pacheco Miguel, M. (2020) Tumor microenvironment components: allies of cancer progression, *Pathol. Res. Pract.*, **216**, 152729, doi: 10.1016/j.prp.2019.152729.
- Batlle, E., and Clevers, H. (2017) Cancer stem cells revisited, *Nat. Med.*, **23**, 1124–1134, doi: 10.1038/nm.4409.
- Capp, J. P. (2019) Cancer stem cells: from historical roots to a new perspective, *J. Oncol.*, **2019**, 5189232, doi: 10.1155/2019/5189232.
- Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F., and Weissman, I. L. (2001) Stem cells, cancer, and cancer stem cells, *Nature*, **414**, 105–111, doi: 10.1038/35102167.
- Brooks, M. D., Burness, M. L., and Wicha, M. S. (2015) Therapeutic implications of cellular heterogeneity and plasticity in breast cancer, *Cell Stem Cell*, **17**, 260–271, doi: 10.1016/j.stem.2015.08.014.
- Sell, S. (2010) On the stem cell origin of cancer, *Am. J. Pathol.*, **176**, 2584–2594, doi: 10.2353/ajpath.2010.091064.
- Sancho, P., Barneda, D., and Heeschen, C. (2016) Hallmarks of cancer stem cell metabolism, *Br. J. Cancer*, **114**, 1305–1312, doi: 10.1038/bjc.2016.152.
- Clarke, M. F., Dick, J. E., Dirks, P. B., Eaves, C. J., Jamieson, C. H. M., Jones, D. L., Visvader, J., Weissman, I. L., and Wahl, G. M. (2006) Cancer stem cells – perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells, *Cancer Res.*, **66**, 9339–9344, doi: 10.1158/0008-5472.can-06-3126.
- Cabrera, M. C., Hollingsworth, R. E., and Hurt, E. M. (2015) Cancer stem cell plasticity and tumor hierarchy, *World J. Stem Cells*, **7**, 27–36, doi: 10.4252/wjsc.v7.i1.27.
- Chaffer, C. L., Brueckmann, I., Scheel, C., Kaestli, A. J., Wiggins, P. A., Rodrigues, L. O., Brooks, M., Reinhardt, F., Su, Y., Polyak, K., Arendt, L. M., Kuperwasser, C., Bieri, B., and Weinberg, R. A. (2011) Normal and neoplastic nonstem cells can spontaneously convert to a stem-like state, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 7950–7955, doi: 10.1073/pnas.1102454108.
- Borovski, T., Melo, F. D. E., Vermeulen, L., and Medema, J. P. (2011) Cancer stem cell niche: the place to be, *Cancer Res.*, **71**, 634–639, doi: 10.1158/0008-5472.can-10-3220.
- Plaks, V., Kong, N. W., and Werb, Z. (2015) The cancer stem cell niche: how essential is the niche in regulating stemness of tumor cells? *Cell Stem Cell*, **16**, 225–238, doi: 10.1016/j.stem.2015.02.015.
- Kim, W. T., and Ryu, C. J. (2017) Cancer stem cell surface markers on normal stem cells, *Bmb Rep.*, **50**, 285–298, doi: 10.5483/BMBRep.2017.50.6.039.
- Bonnet, D., and Dick, J. E. (1997) Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell, *Nat. Med.*, **3**, 730–737, doi: 10.1038/nm0797-730.
- Singh, S. K., Hawkins, C., Clarke, I. D., Squire, J. A., Bayani, J., Hide, T., Henkelman, R. M., Cusimano, M. D., and Dirks, P. B. (2004) Identification of human brain tumour initiating cells, *Nature*, **432**, 396–401, doi: 10.1038/nature03128.
- Liu, G. T., Yuan, X. P., Zeng, Z. H., Tunici, P., Ng, H. S., Abdulkadir, I. R., Lu, L. Z., Irvin, D., Black, K. L., and Yu, J. S. (2006) Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133⁺ cancer stem cells in glioblastoma, *Mol. Cancer*, **5**, 67, doi: 10.1186/1476-4598-5-67.
- Medema, J. P. (2013) Cancer stem cells: the challenges ahead, *Nat. Cell Biol.*, **15**, 338–344, doi: 10.1038/ncb2717.
- Gimple, R. C., Yang, K., Halbert, M. E., Agnihotri, S., and Rich, J. N. (2022) Brain cancer stem cells: resilience through adaptive plasticity and hierarchical heterogeneity, *Nat. Rev. Cancer*, **22**, 497–514, doi: 10.1038/s41568-022-00486-x.
- De Blank, P., Fouladi, M., and Huse, J. T. (2020) Molecular markers and targeted therapy in pediatric low-grade glioma, *J. Neurooncol.*, **150**, 5–15, doi: 10.1007/s11060-020-03529-1.
- Di, W., Fan, W., Wu, F., Shi, Z., Wang, Z., Yu, M., Zhai, Y., Chang, Y., Pan, C., Li, G., Kahlert, U. D., and Zhang, W. (2022) Clinical characterization and immunosuppressive regulation of CD161 (KLRB1) in glioma through 916 samples, *Cancer Sci.*, **113**, 756–769, doi: 10.1111/cas.15236.
- Birko, Z., Nagy, B., Klekner, A., and Virga, J. (2020) Novel molecular markers in glioblastoma-benefits of liquid biopsy, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 7522, doi: 10.3390/ijms21207522.
- Srivastava, M., Ahlawat, N., and Srivastava, A. (2021) Ovarian cancer stem cells: newer horizons, *J. Obstet. Gynaecol. India*, **71**, 115–117, doi: 10.1007/s13224-020-01412-7.
- Barani, M., Bilal, M., Sabir, F., Rahdar, A., and Kyzas, G. Z. (2021) Nanotechnology in ovarian cancer: diagnosis and treatment, *Life Sci.*, **266**, 118914, doi: 10.1016/j.lfs.2020.118914.
- Zhang, R., Siu, M. K. Y., Ngan, H. Y. S., and Chan, K. K. L. (2022) Molecular biomarkers for the early detection of ovarian cancer, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 12041, doi: 10.3390/ijms231912041.

27. Escudero-Lourdes, C., Alvarado-Morales, I., and Tokar, E. J. (2022) Stem cells as target for prostate cancer therapy: opportunities and challenges, *Stem Cell Rev. Rep.*, **18**, 2833-2851, doi: 10.1007/s12015-022-10437-6.
28. Kerr, B. A., Miocinovic, R., Smith, A. K., West, X. Z., Watts, K. E., Alzayed, A. W., Klink, J. C., Mir, M. C., Sturey, T., Hansel, D. E., Heston, W. D., Stephenson, A. J., Klein, E. A., and Byzova, T. V. (2015) CD117⁺ cells in the circulation are predictive of advanced prostate cancer, *Oncotarget*, **6**, 1889-1897, doi: 10.18632/oncotarget.2796.
29. Zhang, K., Zhou, S., Wang, L., Wang, J., Zou, Q., Zhao, W., Fu, Q., and Fang, X. (2016) Current stem cell biomarkers and their functional mechanisms in prostate cancer, *Int. J. Mol. Sci.*, **17**, 1163, doi: 10.3390/ijms17071163.
30. Gupta, R., Bhatt, L. K., Johnston, T. P., and Prabhavalkar, K. S. (2019) Colon cancer stem cells: potential target for the treatment of colorectal cancer, *Cancer Biol. Ther.*, **20**, 1068-1082, doi: 10.1080/15384047.2019.1599660.
31. Chen, K., Huang, Y. H., and Chen, J. L. (2013) Understanding and targeting cancer stem cells: therapeutic implications and challenges, *Acta Pharmacol. Sin.*, **34**, 732-740, doi: 10.1038/aps.2013.27.
32. Ishiwata, T., Matsuda, Y., Yoshimura, H., Sasaki, N., Ishiwata, S., Ishikawa, N., Takubo, K., Arai, T., and Aida, J. (2018) Pancreatic cancer stem cells: features and detection methods, *Pathol. Oncol. Res.*, **24**, 797-805, doi: 10.1007/s12253-018-0420-x.
33. Immervoll, H., Hoem, D., Steffensen, O. J., Miletic, H., and Molven, A. (2011) Visualization of CD44 and CD133 in normal pancreas and pancreatic ductal adenocarcinomas: non-overlapping membrane expression in cell populations positive for both markers, *J. Histochem. Cytochem.*, **59**, 441-455, doi: 10.1369/0022155411398275.
34. Patil, K., Khan, F. B., Akhtar, S., Ahmad, A., and Uddin, S. (2021) The plasticity of pancreatic cancer stem cells: implications in therapeutic resistance, *Cancer Metastasis Rev.*, **40**, 691-720, doi: 10.1007/s10555-021-09979-x.
35. Gu, Y., Zheng, X., and Ji, J. (2020) Liver cancer stem cells as a hierarchical society: yes or no? *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*, **52**, 723-735, doi: 10.1093/abbs/gmaa050.
36. Fang, X., Yan, Q., Liu, S., and Guan, X. Y. (2022) Cancer stem cells in hepatocellular carcinoma: intrinsic and extrinsic molecular mechanisms in stemness regulation, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 12327, doi: 10.3390/ijms232012327.
37. Nio, K., Yamashita, T., and Kaneko, S. (2017) The evolving concept of liver cancer stem cells, *Mol. Cancer*, **16**, 4, doi: 10.1186/s12943-016-0572-9.
38. Joshi, P., Ghadi, D. S., and Waghmare, S. K. (2022) Isolation of cancer stem cells from skin squamous cell carcinoma, *Methods Cell Biol.*, **171**, 63-80, doi: 10.1016/bs.mcb.2022.06.002.
39. Yin, Q., Shi, X., Lan, S., Jin, H., and Wu, D. (2021) Effect of melanoma stem cells on melanoma metastasis, *Oncol. Lett.*, **22**, 566, doi: 10.3892/ol.2021.12827.
40. Zheng, Y., Wang, L., Yin, L., Yao, Z., Tong, R., Xue, J., and Lu, Y. (2022) Lung cancer stem cell markers as therapeutic targets: an update on signaling pathways and therapies, *Front. Oncol.*, **12**, 873994, doi: 10.3389/fonc.2022.873994.
41. Rowbotham, S. P., Goruganthu, M. U. L., Arasada, R. R., Wang, W. Z., Carbone, D. P., and Kim, C. F. (2022) Lung cancer stem cells and their clinical implications, *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, **12**, a041270, doi: 10.1101/cshperspect.a041270.
42. Pustovalova, M., Blokhina, T., Alhaddad, L., Chigasova, A., Chuprov-Netochin, R., Veviorskiy, A., Filkov, G., Osipov, A. N., and Leonov, S. (2022) CD44⁺ and CD133⁺ non-small cell lung cancer cells exhibit DNA damage response pathways and dormant polyploid giant cancer cell enrichment relating to their p53 status, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 4922, doi: 10.3390/ijms23094922.
43. Butti, R., Gunasekaran, V. P., Kumar, T. V. S., Banerjee, P., and Kundu, G. C. (2019) Breast cancer stem cells: Biology and therapeutic implications, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **107**, 38-52, doi: 10.1016/j.biocel.2018.12.001.
44. Wright, M. H., Calcagno, A. M., Salcido, C. D., Carlson, M. D., Ambudkar, S. V., and Varticovski, L. (2008) Brca1 breast tumors contain distinct CD44⁺/CD24⁻ and CD133⁺ cells with cancer stem cell characteristics, *Breast Cancer Res.*, **10**, R10, doi: 10.1186/bcr1855.
45. Farace, C., Pisano, A., Grinan-Lison, C., Solinas, G., Jimenez, G., Serra, M., Carrillo, E., Scognamiglio, F., Attene, F., Montella, A., Marchal, J. A., and Madeddu, R. (2020) Deregulation of cancer-stem-cell-associated miRNAs in tissues and sera of colorectal cancer patients, *Oncotarget*, **11**, 116-130, doi: 10.18632/oncotarget.27411.
46. Aponte, P. M., and Caicedo, A. (2017) Stemness in cancer: stem cells, cancer stem cells, and their microenvironment, *Stem Cells Int.*, **2017**, 5619472, doi: 10.1155/2017/5619472.
47. Visvader, J. E., and Clevers, H. (2016) Tissue-specific designs of stem cell hierarchies, *Nat. Cell Biol.*, **18**, 349-355, doi: 10.1038/ncb3332.
48. Kaseb, H. O., Fohrer-Ting, H., Lewis, D. W., Lagasse, E., and Gollin, S. M. (2016) Identification, expansion and characterization of cancer cells with stem cell properties from head and neck squamous cell carcinomas, *Exp. Cell Res.*, **348**, 75-86, doi: 10.1016/j.yexcr.2016.09.003.
49. Todaro, M., Alea, M. P., Di Stefano, A. B., Cammareri, P., Vermeulen, L., Lovino, F., Tripodo, C.,

- Russo, A., Gulotta, G., Medema, J. P., and Stassi, G. (2007) Colon cancer stem cells dictate tumor growth and resist cell death by production of interleukin-4, *Cell Stem Cell*, **1**, 389-402, doi: 10.1016/j.stem.2007.08.001.
50. Li, C. W., Wu, J. J., Hynes, M., Dosch, J., Sarkar, B., Welling, T. H., di Magliano, M. P., and Simeone, D. M. (2011) c-Met is a marker of pancreatic cancer stem cells and therapeutic target, *Gastroenterology*, **141**, 2218-2227.e5, doi: 10.1053/j.gastro.2011.08.009.
51. Nassar, D., and Blanpain, C. (2016) Cancer stem cells: basic concepts and therapeutic implications, *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.*, **11**, 47-76, doi: 10.1146/annurev-pathol-012615-044438.
52. Laplane, L., and Solary, E. (2019) Towards a classification of stem cells, *Elife*, **8**, e46563, doi: 10.7554/eLife.46563.
53. Yang, L., Shi, P., Zhao, G., Xu, J., Peng, W., Zhang, J., Zhang, G., Wang, X., Dong, Z., Chen, F., and Cui, H. (2020) Targeting cancer stem cell pathways for cancer therapy, *Signal Transduct. Target. Ther.*, **5**, 8, doi: 10.1038/s41392-020-0110-5.
54. Jerabek, S., Merino, F., Scholer, H. R., and Cojocaru, V. (2014) OCT4: dynamic DNA binding pioneers stem cell pluripotency, *Biochim. Biophys. Acta*, **1839**, 138-154, doi: 10.1016/j.bbagr.2013.10.001.
55. Murakami, S., Ninomiya, W., Sakamoto, E., Shibata, T., Akiyama, H., and Tashiro, F. (2015) SRY and OCT4 are required for the acquisition of cancer stem cell-like properties and are potential differentiation therapy targets, *Stem Cells*, **33**, 2652-2663, doi: 10.1002/stem.2059.
56. Du, Z., Jia, D., Liu, S., Wang, F., Li, G., Zhang, Y., Cao, X., Ling, E. A., and Hao, A. (2009) Oct4 is expressed in human gliomas and promotes colony formation in glioma cells, *Glia*, **57**, 724-733, doi: 10.1002/glia.20800.
57. Song, B., Kim, D. K., Shin, J., Bae, S. H., Kim, H. Y., Won, B., Kim, J. K., Youn, H. D., Kim, S. T., Kang, S. W., and Jang, H. (2018) OCT4 directly regulates stemness and extracellular matrix-related genes in human germ cell tumours, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **503**, 1980-1986, doi: 10.1016/j.bbrc.2018.07.145.
58. Fujino, S., and Miyoshi, N. (2019) Oct4 gene expression in primary colorectal cancer promotes liver metastasis, *Stem Cells Int.*, **2019**, 7896524, doi: 10.1155/2019/7896524.
59. Lu, C. S., Shiau, A. L., Su, B. H., Hsu, T. S., Wang, C. T., Su, Y. C., Tsai, M. S., Feng, Y. H., Tseng, Y. L., Yen, Y. T., Wu, C. L., and Shieh, G. S. (2020) Oct4 promotes M2 macrophage polarization through upregulation of macrophage colony-stimulating factor in lung cancer, *J. Hematol. Oncol.*, **13**, 62, doi: 10.1186/s13045-020-00887-1.
60. Hagey, D. W., Klum, S., Kurtsdotter, I., Zaouter, C., Topcic, D., Andersson, O., Bergsland, M., and Muhr, J. (2018) SOX2 regulates common and specific stem cell features in the CNS and endoderm derived organs, *PLoS Genet.*, **14**, e1007224, doi: 10.1371/journal.pgen.1007224.
61. Schaefer, T., and Lengerke, C. (2020) SOX2 protein biochemistry in stemness, reprogramming, and cancer: the PI3K/AKT/SOX2 axis and beyond, *Oncogene*, **39**, 278-292, doi: 10.1038/s41388-019-0997-x.
62. Liu, P., Tang, H., Song, C., Wang, J., Chen, B., Huang, X., Pei, X., and Liu, L. (2018) SOX2 promotes cell proliferation and metastasis in triple negative breast cancer, *Front. Pharmacol.*, **9**, 942, doi: 10.3389/fphar.2018.00942.
63. Maurizi, G., Verma, N., Gadi, A., Mansukhani, A., and Basilico, C. (2018) Sox2 is required for tumor development and cancer cell proliferation in osteosarcoma, *Oncogene*, **37**, 4626-4632, doi: 10.1038/s41388-018-0292-2.
64. Han, S., Huang, T., Wu, X., Wang, X., Liu, S., Yang, W., Shi, Q., Li, H., and Hou, F. (2019) Prognostic value of CD133 and SOX2 in advanced cancer, *J. Oncol.*, **2019**, 3905817, doi: 10.1155/2019/3905817.
65. Heurtier, V., Owens, N., Gonzalez, I., Mueller, F., Proux, C., Mornico, D., Clerc, P., Dubois, A., and Navarro, P. (2019) The molecular logic of Nanog-induced self-renewal in mouse embryonic stem cells, *Nat. Commun.*, **10**, 1109, doi: 10.1038/s41467-019-09041-z.
66. Chiou, S. H., Wang, M. L., Chou, Y. T., Chen, C. J., Hong, C. F., Hsieh, W. J., Chang, H. T., Chen, Y. S., Lin, T. W., Hsu, H. S., and Wu, C. W. (2010) Coexpression of Oct4 and Nanog enhances malignancy in lung adenocarcinoma by inducing cancer stem cell-like properties and epithelial-mesenchymal transdifferentiation, *Cancer Res.*, **70**, 10433-10444, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-2638.
67. Lin, T., Ding, Y. Q., and Li, J. M. (2012) Overexpression of Nanog protein is associated with poor prognosis in gastric adenocarcinoma, *Med. Oncol.*, **29**, 878-885, doi: 10.1007/s12032-011-9860-9.
68. De Vicente, J. C., Rodriguez-Santamarta, T., Rodrigo, J. P., Allonca, E., Vallina, A., Singhania, A., Donate-Perez Del Molino, P., and Garcia-Pedrero, J. M. (2019) The emerging role of NANOG as an early cancer risk biomarker in patients with oral potentially malignant disorders, *J. Clin. Med.*, **8**, 1376, doi: 10.3390/jcm8091376.
69. Dehghan Harati, M., Rodemann, H. P., and Toulany, M. (2019) Nanog signaling mediates radioresistance in ALDH-positive breast cancer cells, *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, 1151, doi: 10.3390/ijms20051151.
70. Wang, X., Jin, J., Wan, F., Zhao, L., Chu, H., Chen, C., Liao, G., Liu, J., Yu, Y., Teng, H., Fang, L., Jiang, C., Pan, W., Xie, X., Li, J., Lu, X., Jiang, X., Ge, X., Ye, D., and Wang, P. (2019) AMPK promotes SPOP-mediated NANOG degradation to regulate prostate cancer cell stemness, *Dev. Cell*, **48**, 345-360. e347, doi: 10.1016/j.devcel.2018.11.033.

71. Ghaleb, A. M., and Yang, V. W. (2017) Kruppel-like factor 4 (KLF4): what we currently know, *Gene*, **611**, 27-37, doi: 10.1016/j.gene.2017.02.025.
72. Hsieh, M. H., Chen, Y. T., Chen, Y. T., Lee, Y. H., Lu, J., Chien, C. L., Chen, H. F., Ho, H. N., Yu, C. J., Wang, Z. Q., and Teng, S. C. (2017) PARP1 controls KLF4-mediated telomerase expression in stem cells and cancer cells, *Nucleic Acids Res.*, **45**, 10492-10503, doi: 10.1093/nar/gkx683.
73. Rivero, M., Montagnani, V., and Stecca, B. (2017) KLF4 is regulated by RAS/RAF/MEK/ERK signaling through E2F1 and promotes melanoma cell growth, *Oncogene*, **36**, 3322-3333, doi: 10.1038/onc.2016.481.
74. Qi, X. T., Li, Y. L., Zhang, Y. Q., Xu, T., Lu, B., Fang, L., Gao, J. Q., Yu, L. S., Zhu, D. F., Yang, B., He, Q. J., and Ying, M. D. (2019) KLF4 functions as an oncogene in promoting cancer stem cell-like characteristics in osteosarcoma cells, *Acta Pharmacol. Sin.*, **40**, 546-555, doi: 10.1038/s41401-18-0050-6.
75. Ding, X., Zhong, T., Jiang, L., Huang, J., Xia, Y., and Hu, R. (2018) miR-25 enhances cell migration and invasion in non-small-cell lung cancer cells via ERK signaling pathway by inhibiting KLF4, *Mol. Med. Rep.*, **17**, 7005-7016, doi: 10.3892/mmr.2018.8772.
76. Wang, B., Shen, A., Ouyang, X., Zhao, G., Du, Z., Huo, W., Zhang, T., Wang, Y., Yang, C., Dong, P., Watari, H., Pfeffer, L. M., and Yue, J. (2017) KLF4 expression enhances the efficacy of chemotherapy drugs in ovarian cancer cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **484**, 486-492, doi: 10.1016/j.bbrc.2017.01.062.
77. Dang, C. V. (2012) MYC on the path to cancer, *Cell*, **149**, 22-35, doi: 10.1016/j.cell.2012.03.003.
78. Galardi, S., Savino, M., Scagnoli, F., Pellegatta, S., Pisati, F., Zambelli, F., Illi, B., Annibali, D., Beji, S., Orecchini, E., Alberelli, M. A., Apicella, C., Fontanella, R. A., Michienzi, A., Finocchiaro, G., Farace, M. G., Pavesi, G., Ciafre, S. A., and Nasi, S. (2016) Resetting cancer stem cell regulatory nodes upon MYC inhibition, *EMBO Rep.*, **17**, 1872-1889, doi: 10.15252/embr.201541489.
79. Lourenco, C., Kalkat, M., Houlahan, K. E., De Melo, J., Longo, J., Done, S. J., Boutros, P. C., and Penn, L. Z. (2019) Modelling the MYC-driven normal-to-tumour switch in breast cancer, *Dis. Model. Mech.*, **12**, dmm038083, doi: 10.1242/dmm.038083.
80. Dong, H., Hu, J., Wang, L., Qi, M., Lu, N., Tan, X., Yang, M., Bai, X., Zhan, X., and Han, B. (2019) SOX4 is activated by C-MYC in prostate cancer, *Med. Oncol.*, **36**, 92, doi: 10.1007/s12032-019-1317-6.
81. Fabregat, I., Malfettone, A., and Soukupova, J. (2016) New insights into the crossroads between EMT and stemness in the context of cancer, *J. Clin. Med.*, **5**, 37, doi: 10.3390/jcm5030037.
82. Katoh, M. (2007) Networking of WNT, FGF, Notch, BMP, and Hedgehog signaling pathways during carcinogenesis, *Stem Cell Rev.*, **3**, 30-38, doi: 10.1007/s12015-007-0006-6.
83. Visvader, J. E., and Lindeman, G. J. (2012) Cancer stem cells: current status and evolving complexities, *Cell Stem Cell*, **10**, 717-728, doi: 10.1016/j.stem.2012.05.007.
84. Clements, W. M., Wang, J., Sarnaik, A., Kim, O. J., MacDonald, J., Fenoglio-Preiser, C., Groden, J., and Lowy, A. M. (2002) beta-Catenin mutation is a frequent cause of Wnt pathway activation in gastric cancer, *Cancer Res.*, **62**, 3503-3506.
85. Abd El-Rehim, D., and Ali, M. M. (2009) Aberrant expression of beta-catenin in invasive ductal breast carcinomas, *J. Egypt. Natl. Canc. Inst.*, **21**, 185-195.
86. Kudo, J., Nishiwaki, T., Haruki, N., Ishiguro, H., Shibata, Y., Terashita, Y., Sugiura, H., Shinoda, N., Kimura, M., Kuwabara, Y., and Fujii, Y. (2007) Aberrant nuclear localization of β -catenin without genetic alterations in beta-catenin or Axin genes in esophageal cancer, *World J. Surg. Oncol.*, **5**, 21, doi: 10.1186/1477-7819-5-21.
87. Zhao, X., Jiang, C., Xu, R., Liu, Q., Liu, G., and Zhang, Y. (2020) TRIP6 enhances stemness property of breast cancer cells through activation of Wnt/beta-catenin, *Cancer Cell Int.*, **20**, 51, doi: 10.1186/s12935-020-1136-z.
88. Zhu, L., Pan, R., Zhou, D., Ye, G., and Tan, W. (2019) BCL11A enhances stemness and promotes progression by activating Wnt/beta-catenin signaling in breast cancer, *Cancer Manag. Res.*, **11**, 2997-3007, doi: 10.2147/CMAR.S199368.
89. Zhang, L., Dong, X., Yan, B., Yu, W., and Shan, L. (2020) CircAGFG1 drives metastasis and stemness in colorectal cancer by modulating YY1/CTNBN1, *Cell Death Dis.*, **11**, 542, doi: 10.1038/s41419-020-2707-6.
90. Xiang, X., Xiong, R., Yu, C., Deng, L., Bie, J., Xiao, D., Chen, Z., Zhou, Y., Li, X., Liu, K., and Feng, G. (2019) Tex10 promotes stemness and EMT phenotypes in esophageal squamous cell carcinoma via the Wnt/betacatenin pathway, *Oncol. Rep.*, **42**, 2600-2610, doi: 10.3892/or.2019.7376.
91. Stylianou, S., Clarke, R. B., and Brennan, K. (2006) Aberrant activation of notch signaling in human breast cancer, *Cancer Res.*, **66**, 1517-1525, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-3054.
92. Li, L., Tang, P., Li, S., Qin, X., Yang, H., Wu, C., and Liu, Y. (2017) Notch signaling pathway networks in cancer metastasis: a new target for cancer therapy, *Med. Oncol.*, **34**, 180, doi: 10.1007/s12032-017-1039-6.
93. Katoh, M., and Katoh, M. (2020) Precision medicine for human cancers with Notch signaling dysregulation (Review), *Int. J. Mol. Med.*, **45**, 279-297, doi: 10.3892/ijmm.2019.4418.
94. Amantini, C., Morelli, M. B., Nabissi, M., Cardinali, C., Santoni, M., Gismondi, A., and Santoni, G.

- (2016) Capsaicin triggers autophagic cell survival which drives epithelial mesenchymal transition and chemoresistance in bladder cancer cells in an Hedgehog-dependent manner, *Oncotarget*, **7**, 50180-50194, doi: 10.18632/oncotarget.10326.
95. Villegas, V. E., Rondon-Lagos, M., Annaratone, L., Castellano, I., Grismaldo, A., Sapino, A., and Zaphiropoulos, P. G. (2016) Tamoxifen treatment of breast cancer cells: impact on Hedgehog/GLI1 signaling, *Int. J. Mol. Sci.*, **17**, 308, doi: 10.3390/ijms17030308.
 96. Jeng, K. S., Chang, C. F., and Lin, S. S. (2020) Sonic hedgehog signaling in organogenesis, tumors, and tumor microenvironments, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 758, doi: 10.3390/ijms21030758.
 97. Petrova, R., and Joyner, A. L. (2014) Roles for Hedgehog signaling in adult organ homeostasis and repair, *Development*, **141**, 3445-3457, doi: 10.1242/dev.083691.
 98. Po, A., Silvano, M., Miele, E., Capalbo, C., Eramo, A., Salvati, V., Todaro, M., Besharat, Z. M., Catanzaro, G., Cucchi, D., Coni, S., Di Marcotullio, L., Canettieri, G., Vacca, A., Stassi, G., De Smaele, E., Tartaglia, M., Screpanti, I., De Maria, R., and Ferretti, E. (2017) Noncanonical GLI1 signaling promotes stemness features and in vivo growth in lung adenocarcinoma, *Oncogene*, **36**, 4641-4652, doi: 10.1038/onc.2017.91.
 99. Zhu, R., Gires, O., Zhu, L., Liu, J., Li, J., Yang, H., Ju, G., Huang, J., Ge, W., Chen, Y., Lu, Z., and Wang, H. (2019) TSPAN8 promotes cancer cell stemness via activation of sonic Hedgehog signaling, *Nat. Commun.*, **10**, 2863, doi: 10.1038/s41467-019-10739-3.
 100. Hayden, M. S., and Ghosh, S. (2008) Shared principles in NF-kappaB signaling, *Cell*, **132**, 344-362, doi: 10.1016/j.cell.2008.01.020.
 101. Prasad, S., Rarnachandran, S., Gupta, N., Kaushik, I., and Srivastava, S. K. (2020) Cancer cells stemness: A doorstep to targeted therapy, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Bas. Dis.*, **1866**, 165424, doi: 10.1016/j.bbdis.2019.02.019.
 102. Prasad, S., Ravindran, J., and Aggarwal, B. B. (2010) NF-kappaB and cancer: how intimate is this relationship, *Mol. Cell. Biochem.*, **336**, 25-37, doi: 10.1007/s11010-009-0267-2.
 103. Van der Zee, M., Sacchetti, A., Cansoy, M., Joosten, R., Teeuwssen, M., Heijmans-Antonissen, C., Ewing-Graham, P. C., Burger, C. W., Blok, L. J., and Fodde, R. (2015) IL6/JAK1/STAT3 signaling blockade in endometrial cancer affects the ALDHhi/CD126⁺ stem-like component and reduces tumor burden, *Cancer Res.*, **75**, 3608-3622, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-2498.
 104. Yang, L., Dong, Y., Li, Y., Wang, D., Liu, S., Wang, D., Gao, Q., Ji, S., Chen, X., Lei, Q., Jiang, W., Wang, L., Zhang, B., Yu, J. J., and Zhang, Y. (2019) IL-10 derived from M2 macrophage promotes cancer stemness via JAK1/STAT1/NF-kappaB/Notch1 pathway in non-small cell lung cancer, *Int. J. Cancer*, **145**, 1099-1110, doi: 10.1002/ijc.32151.
 105. Park, S. Y., Lee, C. J., Choi, J. H., Kim, J. H., Kim, J. W., Kim, J. Y., and Nam, J. S. (2019) The JAK2/STAT3/CCND2 axis promotes colorectal cancer stem cell persistence and radioresistance, *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, **38**, 399, doi: 10.1186/s13046-019-1405-7.
 106. Toh, T. B., Lim, J. J., Hooi, L., Rashid, M., and Chow, E. K. (2020) Targeting Jak/Stat pathway as a therapeutic strategy against SP/CD44⁺ tumorigenic cells in Akt/beta-catenin-driven hepatocellular carcinoma, *J. Hepatol.*, **72**, 104-118, doi: 10.1016/j.jhep.2019.08.035.
 107. Chambers, I. (2004) The molecular basis of pluripotency in mouse embryonic stem cells, *Cloning Stem Cells*, **6**, 386-391, doi: 10.1089/clo.2004.6.386.
 108. Zhou, J., Wulfschle, J., Zhang, H., Gu, P., Yang, Y., Deng, J., Margolick, J. B., Liotta, L. A., Petricoin, E., 3rd, and Zhang, Y. (2007) Activation of the PTEN/mTOR/STAT3 pathway in breast cancer stem-like cells is required for viability and maintenance, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 16158-16163, doi: 10.1073/pnas.0702596104.
 109. Kaowinn, S., Kaewpiboon, C., Koh, S. S., Kramer, O. H., and Chung, Y. H. (2018) STAT1HDAC4 signaling induces epithelialmesenchymal transition and sphere formation of cancer cells overexpressing the oncogene, CUG2, *Oncol. Rep.*, **40**, 2619-2627, doi: 10.3892/or.2018.6701.
 110. Dey, N., De, P., and Leyland-Jones, B. (2017) PI3K-AKT-mTOR inhibitors in breast cancers: from tumor cell signaling to clinical trials, *Pharmacol. Ther.*, **175**, 91-106, doi: 10.1016/j.pharmthera.2017.02.037.
 111. Tan, A. C. (2020) Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway in non-small cell lung cancer (NSCLC), *Thorac. Cancer*, **11**, 511-518, doi: 10.1111/1759-7714.13328.
 112. Karami Fath, M., Ebrahimi, M., Nourbakhsh, E., Zia Hazara, A., Mirzaei, A., Shafieyari, S., Salehi, A., Hoseinzadeh, M., Payandeh, Z., and Barati, G. (2022) PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in cancer stem cells, *Pathol. Res. Pract.*, **237**, 154010, doi: 10.1016/j.prp.2022.154010.
 113. Nepstad, I., Hatfield, K. J., Gronningsaeter, I. S., and Reikvam, H. (2020) The PI3K-Akt-mTOR signaling pathway in human acute myeloid leukemia (AML) cells, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 2907, doi: 10.3390/ijms21082907.
 114. Madsen, R. R. (2020) PI3K in stemness regulation: from development to cancer, *Biochem. Soc. Trans.*, **48**, 301-315, doi: 10.1042/BST20190778.
 115. Fitzgerald, T. L., Lertpiriyapong, K., Cocco, L., Martelli, A. M., Libra, M., Candido, S., Montalto, G., Cervello, M., Steelman, L., Abrams, S. L., and McCubrey, J. A. (2015) Roles of EGFR and KRAS

- and their downstream signaling pathways in pancreatic cancer and pancreatic cancer stem cells, *Adv. Biol. Regul.*, **59**, 65-81, doi: 10.1016/j.jbior.2015.06.003.
116. Nangia-Makker, P., Hogan, V., and Raz, A. (2018) Galectin-3 and cancer stemness, *Glycobiology*, **28**, 172-181, doi: 10.1093/glycob/cwy001.
 117. Li, Y., Hu, H., Wang, Y., Fan, Y., Yang, Y., Guo, B., Xie, X., Lian, J., Jiang, B., Han, B., Wang, Y., Shao, C., and Gong, Y. (2020) CUL4B contributes to cancer stemness by repressing tumor suppressor miR34a in colorectal cancer, *Oncogenesis*, **9**, 20, doi: 10.1038/s41389-020-0206-3.
 118. Ramadoss, S., Sen, S., Ramachandran, I., Roy, S., Chaudhuri, G., and Farias-Eisner, R. (2017) Lysine-specific demethylase KDM3A regulates ovarian cancer stemness and chemoresistance, *Oncogene*, **36**, 1537-1545, doi: 10.1038/onc.2016.320.
 119. Kim, H. Y., Kim, D. K., Bae, S. H., Gwak, H., Jeon, J. H., Kim, J. K., Lee, B. I., You, H. J., Shin, D. H., Kim, Y. H., Kim, S. Y., Han, S. S., Shim, J. K., Lee, J. H., Kang, S. G., and Jang, H. (2018) Farnesyl diphosphate synthase is important for the maintenance of glioblastoma stemness, *Exp. Mol. Med.*, **50**, 1-12, doi: 10.1038/s12276-018-0166-2.
 120. Mei, Y., Cai, D., and Dai, X. (2020) Modulating cancer stemness provides luminal a breast cancer cells with HER2 positive-like features, *J. Cancer*, **11**, 1162-1169, doi: 10.7150/jca.37117.
 121. Ouspenskaia, T., Matos, I., Mertz, A. F., Fiore, V. F., and Fuchs, E. (2016) WNT-SHH antagonism specifies and expands stem cells prior to niche formation, *Cell*, **164**, 156-169, doi: 10.1016/j.cell.2015.11.058.
 122. Wahlster, L., and Daley, G. Q. (2016) Progress towards generation of human haematopoietic stem cells, *Nat. Cell. Biol.*, **18**, 1111-1117, doi: 10.1038/ncb3419.
 123. Beck, B., Driessens, G., Goossens, S., Youssef, K. K., Kuchnio, A., Caauwe, A., Sotiropoulou, P. A., Loges, S., Lapouge, G., Candi, A., Mascré, G., Drogat, B., Dekoninck, S., Haigh, J. J., Carmeliet, P., and Blanpain, C. (2011) A vascular niche and a VEGF-Nrp1 loop regulate the initiation and stemness of skin tumours, *Nature*, **478**, 399-403, doi: 10.1038/nature10525.
 124. Zhang, Z., Dong, Z., Lauxen, I. S., Filho, M. S., and Nor, J. E. (2014) Endothelial cell-secreted EGF induces epithelial to mesenchymal transition and endows head and neck cancer cells with stem-like phenotype, *Cancer Res.*, **74**, 2869-2881, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-2032.
 125. Yu, Y., Xiao, C. H., Tan, L. D., Wang, Q. S., Li, X. Q., and Feng, Y. M. (2014) Cancer-associated fibroblasts induce epithelial-mesenchymal transition of breast cancer cells through paracrine TGF-beta signalling, *Br. J. Cancer*, **110**, 724-732, doi: 10.1038/bjc.2013.768.
 126. Bao, B., Azmi, A. S., Ali, S., Ahmad, A., Li, Y., Banerjee, S., Kong, D., and Sarkar, F. H. (2012) The biological kinship of hypoxia with CSC and EMT and their relationship with deregulated expression of miRNAs and tumor aggressiveness, *Biochim. Biophys. Acta*, **1826**, 272-296, doi: 10.1016/j.bbcan.2012.04.008.
 127. Joseph, J. V., Conroy, S., Pavlov, K., Sontakke, P., Tomar, T., Eggens-Meijer, E., Balasubramanian, V., Wagemakers, M., den Dunnen, W. F., and Kruyt, F. A. (2015) Hypoxia enhances migration and invasion in glioblastoma by promoting a mesenchymal shift mediated by the HIF1alpha-ZEB1 axis, *Cancer Lett.*, **359**, 107-116, doi: 10.1016/j.canlet.2015.01.010.
 128. Zhang, M., Xu, C., Wang, H. Z., Peng, Y. N., Li, H. O., Zhou, Y. J., Liu, S., Wang, F., Liu, L., Chang, Y., Zhao, Q., and Liu, J. (2019) Soft fibrin matrix downregulates DAB2IP to promote Nanog-dependent growth of colon tumor-repopulating cells, *Cell Death Dis.*, **10**, 151, doi: 10.1038/s41419-019-1309-7.
 129. Valadão, I. C., Ralph, A. C. L., Bordeleau, F., Dzik, L. M., Borbely, K. S. C., Geraldo, M. V., Reinhart-King, C. A., and Freitas, V. M. (2020) High type I collagen density fails to increase breast cancer stem cell phenotype, *PeerJ*, **8**, e9153, doi: 10.7717/peerj.9153.
 130. Zhang, C., Ma, K., and Li, W. Y. (2019) IL-6 promotes cancer stemness and oncogenicity in U2OS and MG-63 osteosarcoma cells by upregulating the OPN-STAT3 pathway, *J. Cancer*, **10**, 6511-6525, doi: 10.7150/jca.29931.
 131. Li, Y., Wang, L., Pappan, L., Galliher-Beckley, A., and Shi, J. (2012) IL-1beta promotes stemness and invasiveness of colon cancer cells through Zeb1 activation, *Mol. Cancer*, **11**, 87, doi: 10.1186/1476-4598-11-87.
 132. Hong, H. S., Akhavan, J., Lee, S. H., Kim, R. H., Kang, M. K., Park, N. H., and Shin, K. H. (2020) Proinflammatory cytokine TNFalpha promotes HPV-associated oral carcinogenesis by increasing cancer stemness, *Int. J. Oral Sci.*, **12**, 3, doi: 10.1038/s41368-019-0069-7.
 133. Bronisz, A., Wang, Y., Nowicki, M. O., Peruzzi, P., Ansari, K. I., Ogawa, D., Balaj, L., De Rienzo, G., Mineo, M., Nakano, I., Ostrowski, M. C., Hochberg, F., Weissleder, R., Lawler, S. E., Chiocca, E. A., and Godlewski, J. (2014) Extracellular vesicles modulate the glioblastoma microenvironment via a tumor suppression signaling network directed by miR-1, *Cancer Res.*, **74**, 738-750, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-2650.
 134. Hu, Y. B., Yan, C., Mu, L., Huang, K. Y., Li, X. L., Tao, D. D., Wu, Y. Q., and Qin, J. C. (2015) Fibroblast-derived exosomes contribute to chemoresistance through priming cancer stem cells in colorectal cancer, *PLoS One*, **10**, e0125625, doi: 10.1371/journal.pone.0125625.
 135. Bruno, S., Collino, F., Deregibus, M. C., Grange, C., Tetta, C., and Camussi, G. (2013) Microvesicles

- derived from human bone marrow mesenchymal stem cells inhibit tumor growth, *Stem Cells Dev.*, **22**, 758-771, doi: 10.1089/scd.2012.0304.
136. Zhang, X., Tu, H., Yang, Y., Fang, L., Wu, Q., and Li, J. (2017) Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles: roles in tumor growth, progression, and drug resistance, *Stem Cells Int.*, **2017**, 1758139, doi: 10.1155/2017/1758139.
 137. Weiswald, L. B., Bellet, D., and Dangles-Marie, V. (2015) Spherical cancer models in tumor biology, *Neoplasia*, **17**, 1-15, doi: 10.1016/j.neo.2014.12.004.
 138. Gupta, P. B., Onder, T. T., Jiang, G., Tao, K., Kuperwasser, C., Weinberg, R. A., and Lander, E. S. (2009) Identification of selective inhibitors of cancer stem cells by high-throughput screening, *Cell*, **138**, 645-659, doi: 10.1016/j.cell.2009.06.034.
 139. Oskarsson, T., Acharyya, S., Zhang, X. H., Vanharanta, S., Tavazoie, S. F., Morris, P. G., Downey, R. J., Manova-Todorova, K., Brogi, E., and Massague, J. (2011) Breast cancer cells produce tenascin C as a metastatic niche component to colonize the lungs, *Nat. Med.*, **17**, 867-874, doi: 10.1038/nm.2379.
 140. Ishiguro, T., Ohata, H., Sato, A., Yamawaki, K., Enomoto, T., and Okamoto, K. (2017) Tumor-derived spheroids: relevance to cancer stem cells and clinical applications, *Cancer Sci.*, **108**, 283-289, doi: 10.1111/cas.13155.
 141. Singh, S. K., Clarke, I. D., Terasaki, M., Bonn, V. E., Hawkins, C., Squire, J., and Dirks, P. B. (2003) Identification of a cancer stem cell in human brain tumors, *Cancer Res.*, **63**, 5821-5828.
 142. Ponti, D., Costa, A., Zaffaroni, N., Pratesi, G., Petrangolini, G., Coradini, D., Pilotti, S., Pierotti, M. A., and Daidone, M. G. (2005) Isolation and *in vitro* propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties, *Cancer Res.*, **65**, 5506-5511, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-0626.
 143. Gilazieva, Z., Ponomarev, A., Rutland, C., Rizvanov, A., and Solovyeva, V. (2020) Promising applications of tumor spheroids and organoids for personalized medicine, *Cancers (Basel)*, **12**, 2727, doi: 10.3390/cancers12102727.
 144. Han, S. J., Kwon, S., and Kim, K. S. (2021) Challenges of applying multicellular tumor spheroids in preclinical phase, *Cancer Cell Int.*, **21**, 152, doi: 10.1186/s12935-021-01853-8.
 145. Hirschhaeuser, F., Menne, H., Dittfeld, C., West, J., Mueller-Klieser, W., and Kunz-Schughart, L. A. (2010) Multicellular tumor spheroids: an underestimated tool is catching up again, *J. Biotechnol.*, **148**, 3-15, doi: 10.1016/j.jbiotec.2010.01.012.
 146. Costa, E. C., Moreira, A. F., de Melo-Diogo, D., Gaspar, V. M., Carvalho, M. P., and Correia, I. J. (2016) 3D tumor spheroids: an overview on the tools and techniques used for their analysis, *Biotechnol. Adv.*, **34**, 1427-1441, doi: 10.1016/j.biotechadv.2016.11.002.
 147. Jensen, C., and Teng, Y. (2020) Is it time to start transitioning from 2D to 3D cell culture? *Front. Mol. Biosci.*, **7**, 33, doi: 10.3389/fmolb.2020.00033.
 148. Forte, E., Chimenti, I., Rosa, P., Angelini, F., Pagano, F., Calogero, A., Giacomello, A., and Messina, E. (2017) EMT/MET at the crossroad of stemness, regeneration and oncogenesis: the ying-yang equilibrium recapitulated in cell spheroids, *Cancers*, **9**, 98, doi: 10.3390/cancers9080098.
 149. Eyler, C. E., Foo, W. C., Lafiura, K. M., McLendon, R. E., Hjelmeland, A. B., and Rich, J. N. (2008) Brain cancer stem cells display preferential sensitivity to Akt inhibition, *Stem Cells*, **26**, 3027-3036, doi: 10.1634/stemcells.2007-1073.
 150. Lindemann, R. K. (2008) Stroma-initiated hedgehog signaling takes center stage in B-cell lymphoma, *Cancer Res.*, **68**, 961-964, doi: 10.1158/0008-5472.can-07-5500.
 151. Namiki, K., Wongsirisin, P., Yokoyama, S., Sato, M., Rawangkan, A., Sakai, R., Iida, K., and Suganuma, M. (2020) (–)-Epigallocatechin gallate inhibits stemness and tumourigenicity stimulated by AXL receptor tyrosine kinase in human lung cancer cells, *Sci. Rep.*, **10**, 2444, doi: 10.1038/s41598-020-59281-z.
 152. Fendler, A., Bauer, D., Busch, J., Jung, K., Wulf-Goldenberg, A., Kunz, S., Song, K., Myszczyzyn, A., Elezkurtaj, S., Erguen, B., Jung, S., Chen, W., and Birchmeier, W. (2020) Inhibiting WNT and NOTCH in renal cancer stem cells and the implications for human patients, *Nat. Commun.*, **11**, 929, doi: 10.1038/s41467-020-14700-7.
 153. Stewart, M., and Fox, S. E. (1989) Firing relations of medial septal neurons to the hippocampal theta-rhythm in urethane anesthetized rats, *Exp. Brain Res.*, **77**, 507-516, doi: 10.1007/BF00249604.
 154. Qureshi-Baig, K., Ullmann, P., Rodriguez, F., Frasquilho, S., Nazarov, P. V., Haan, S., and Letellier, E. (2016) What do we learn from spheroid culture systems? Insights from tumorspheres derived from primary colon cancer tissue, *PLoS One*, **11**, e0146052, doi: 10.1371/journal.pone.0146052.
 155. Zhang, S., Balch, C., Chan, M. W., Lai, H. C., Matei, D., Schilder, J. M., Yan, P. S., Huang, T. H. M., and Nephew, K. P. (2008) Identification and characterization of ovarian cancer-initiating cells from primary human tumors, *Cancer Res.*, **68**, 4311-4320, doi: 10.1158/0008-5472.can-08-0364.
 156. Rashidi, M. R. W., Mehta, P., Bregenzer, M., Raghavan, S., Fleck, E. M., Horst, E. N., Harissa, Z., Ravikumar, V., Brady, S., Bild, A., Rao, A., Buckanovich, R. J., and Mehta, G. (2019) Engineered 3D model of cancer stem cell enrichment and chemoresistance, *Neoplasia*, **21**, 822-836, doi: 10.1016/j.neo.2019.06.005.
 157. Bahmad, H. F., Cheaito, K., Chalhoub, R. M., Hadadeh, O., Monzer, A., Ballout, F., El-Hajj, A.,

- Mukherji, D., Liu, Y. N., Daoud, G., and Abou-Kheir, W. (2018) Sphere-formation assay: three-dimensional *in vitro* culturing of prostate cancer stem/progenitor sphere-forming cells, *Front. Oncol.*, **8**, 347, doi: 10.3389/fonc.2018.00347.
158. Rybak, A. P., He, L. Z., Kapoor, A., Cutz, J. C., and Tang, D. (2011) Characterization of sphere-propagating cells with stem-like properties from DU145 prostate cancer cells, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.*, **1813**, 683-694, doi: 10.1016/j.bbamcr.2011.01.018.
159. Herheliuk, T., Perepelytsina, O., Ugnivenko, A., Ostapchenko, L., and Sydorenko, M. (2019) Investigation of multicellular tumor spheroids enriched for a cancer stem cell phenotype, *Stem Cell Invest.*, **6**, 21-21, doi: 10.21037/sci.2019.06.07.
160. Cao, L., Zhou, Y. M., Zhai, B. B., Liao, J., Xu, W., Zhang, R. X., Li, J., Zhang, Y., Chen, L., Qian, H. H., Wu, M. C., and Yin, Z. F. (2011) Sphere-forming cell subpopulations with cancer stem cell properties in human hepatoma cell lines, *BMC Gastroenterol.*, **11**, 71, doi: 10.1186/1471-230x-11-71.
161. Maliszewska-Olejniczak, K., Brodaczevska, K. K., Bielecka, Z. F., Solarek, W., Kornakiewicz, A., Szczylik, C., Porta, C., and Czarnecka, A. M. (2019) Development of extracellular matrix supported 3D culture of renal cancer cells and renal cancer stem cells, *Cytotechnology*, **71**, 149-163, doi: 10.1007/s10616-018-0273-x.
162. Chen, L., Xiao, Z. F., Meng, Y., Zhao, Y. N., Han, J., Su, G. N., Chen, B., and Dai, J. W. (2012) The enhancement of cancer stem cell properties of MCF-7 cells in 3D collagen scaffolds for modeling of cancer and anti-cancer drugs, *Biomaterials*, **33**, 1437-1444, doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.10.056.
163. Farace, C., Oliver, J. A., Melguizo, C., Alvarez, P., Bandiera, P., Rama, A. R., Malaguarnera, G., Ortiz, R., Madeddu, R., and Prados, J. (2015) Microenvironmental modulation of decorin and lumican in temozolomide-resistant glioblastoma and neuroblastoma cancer stem-like cells, *PLoS One*, **10**, e0134111, doi: 10.1371/journal.pone.0134111.
164. Gao, W. J., Wu, D. L., Wang, Y. L., Wang, Z., Zou, C., Dai, Y., Ng, C. F., Teoh, J. Y. C., and Chan, F. L. (2018) Development of a novel and economical agar-based non-adherent three-dimensional culture method for enrichment of cancer stem-like cells, *Stem Cell Res. Ther.*, **9**, 243, doi: 10.1186/s13287-018-0987-x.
165. Chen, S. F., Chang, Y. C., Nieh, S., Liu, C. L., Yang, C. Y., and Lin, Y. S. (2012) Nonadhesive culture system as a model of rapid sphere formation with cancer stem cell properties, *PLoS One*, **7**, e31864, doi: 10.1371/journal.pone.0031864.
166. Zhu, Z. W., Chen, L., Liu, J. X., Huang, J. W., Wu, G., Zheng, Y. F., and Yao, K. T. (2018) A novel three-dimensional tumorsphere culture system for the efficient and low-cost enrichment of cancer stem cells with natural polymers, *Exper. Ther. Med.*, **15**, 85-92, doi: 10.3892/etm.2017.5419.
167. Muenzner, J. K., Kunze, P., Lindner, P., Polaschek, S., Menke, K., Eckstein, M., Geppert, C. I., Chanvorachote, P., Baeuerle, T., Hartmann, A., and Schneider-Stock, R. (2018) Generation and characterization of hepatocellular carcinoma cell lines with enhanced cancer stem cell potential, *J. Cell. Mol. Med.*, **22**, 6238-6248, doi: 10.1111/jcmm.13911.
168. Xue, J. G., Zhu, Y., Sun, Z. X., Ji, R. B., Zhang, X., Xu, W. R., Yuan, X., Zhang, B., Yan, Y. M., Yin, L., Xu, H. J., Zhang, L. L., Zhu, W., and Qian, H. (2015) Tumorigenic hybrids between mesenchymal stem cells and gastric cancer cells enhanced cancer proliferation, migration and stemness, *BMC Cancer*, **15**, 793, doi: 10.1186/s12885-015-1780-1.
169. Nath, S., and Devi, G. R. (2016) Three-dimensional culture systems in cancer research: focus on tumor spheroid model, *Pharmacol. Ther.*, **163**, 94-108, doi: 10.1016/j.pharmthera.2016.03.013.

MOLECULAR MECHANISMS OF TUMOR CELL STEMNESS MODULATION DURING FORMATION OF SPHEROIDS: A REVIEW

Review

A. S. Ponomarev, Z. E. Gilazieva, V. V. Solovyova, and A. A. Rizvanov*

Kazan (Volga Region) Federal University,
420008 Kazan, Republic of Tatarstan, Russia; e-mail: rizvanov@gmail.com

Cancer stem cells (CSCs), their properties and interaction with the microenvironment are of interest in modern medicine and biology. There are many studies on the emergence of CSCs and their involvement in tumor pathogenesis. The most important property inherent to CSCs is their stemness. Stemness combines the ability of the cell to maintain its pluripotency, give rise to differentiated cells and interact with the

environment to maintain a balance between dormancy, proliferation and regeneration. While adult stem cells exhibit these properties by participating in tissue homeostasis, CSCs behave as their malignant equivalents. High tumor resistance to therapy, the ability to differentiate, activate angiogenesis and metastasis arise precisely due to stemness of CSCs. These cells can be used as a target for therapy of different types of cancer. Laboratory models are needed to study cancer biology and find new therapeutic strategies. A promising direction is three-dimensional tumor models or spheroids. Such models form properties resembling stemness in a natural tumor. By modifying spheroids, it becomes possible to investigate the effect of therapy on CSCs, thus contributing to the development of anti-tumor drug test systems. The review examines the niche of CSCs, the possibility of their study using three-dimensional spheroids, and existing markers for assessing stemness of CSCs.

Keywords: tumor stem cells, stemness, malignant neoplasms, tumor spheroids, tumor microenvironment, transcription factors, test system

ВЛИЯНИЕ ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ДНК ИЗ СЫВОРОТКИ КРОВИ ЗДОРОВЫХ МЫШЕЙ И МЫШЕЙ С МЕТАСТАТИЧЕСКОЙ МЕЛАНОМОЙ В16 НА ИЗМЕНЕНИЕ ОНКОГЕННЫХ СВОЙСТВ КЛЕТОК МЕЛАНОМЫ

© 2023 А.А. Филатова^{1,2}, Л.А. Алексеева¹, И.А. Савин¹, А.В. Сенькова¹,
М.А. Зенкова¹, Н.Л. Миронова^{1*}

¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины, СО РАН,
630090 Новосибирск, Россия; электронная почта: miroнова@niboch.nsc.ru

² Новосибирский государственный университет, факультет естественных наук,
630090 Новосибирск, Россия

Поступила в редакцию 31.01.2023

После доработки 13.03.2023

Принята к публикации 13.03.2023

В настоящее время значительное повышение уровней внеклеточной ДНК (внДНК) в крови пациентов является общепризнанным маркером развития онкологических заболеваний. Несмотря на то что такая опухоль-ассоциированная внДНК хорошо изучена, ее биологические функции остаются невыясненными. В данной работе мы исследовали влияние внДНК, выделенной из сыворотки крови мышей с метастатической меланомой В16-F10, на поведение клеток меланомы В16-F10 *in vitro*. Было обнаружено, что состав внДНК мышей с меланомой значительно отличается от внДНК сыворотки крови здоровых мышей и по представленности онкогенов и мобильных генетических элементов (МГЭ) схож с геномной ДНК клеток В16. Показано, что внДНК из сыворотки крови мышей с меланомой проникала в клетки В16, вследствие чего в клетках увеличивалась представленность фрагментов онкогенов и МГЭ, и вызывала увеличение экспрессии мРНК *Dnase II3*, кодирующего секретируемую ДНКазу, в 5 раз при отсутствии изменения экспрессии мРНК онкогенов *Jun*, *Fos*, *Ras* и *Myс*. ВнДНК здоровых мышей вызывала активацию экспрессии мРНК *EndoG*, кодирующего внутриклеточную регуляторную ДНКазу, и повышение в 4 раза экспрессии мРНК онкогенов *Fos* и *Ras*, являющихся триггерами большого числа сигнальных каскадов от ингибирования апоптоза до усиления пролиферации опухолевых клеток. Таким образом, очевидно, что циркулирующая внДНК способна проникать в клетки и, несмотря на то что не было обнаружено изменений на уровне жизнеспособности и миграционной активности опухолевых клеток, внДНК даже при однократном воздействии способна вызывать на клеточном уровне изменения, усиливающие онкогенность клеток-реципиентов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: циркулирующие внеклеточные ДНК, меланома В16.

DOI: 10.31857/S0320972523070114, **EDN:** FYAWBZ

ВВЕДЕНИЕ

Развитие онкологических заболеваний у пациентов часто сопровождается повышением уровня циркулирующих внеклеточных ДНК (внДНК) в крови [1]. Существует три основных источника внДНК: опухолевые клетки, как находящиеся в первичном опухолевом узле, так и циркулирующие в кровотоке при запущенных стадиях заболевания; клетки опухолевого

окружения, гибнущие при развитии заболевания; и клетки иммунной системы, преимущественно макрофаги и нейтрофилы [2]. Состав циркулирующих внДНК зависит от типа онкологического заболевания и его стадии, поэтому многие исследователи используют анализ профиля внДНК для диагностики и мониторинга опухолевого процесса. Для некоторых типов рака, где состав внДНК в основном отражает особенности ДНК и хроматина опухолевой

Принятые сокращения: внДНК – внеклеточные ДНК; МГЭ – мобильные генетические элементы; h-внДНК – внДНК здоровых мышей; В16-ДНК – суммарная ДНК клеток В16; В16_{см}-внДНК – внДНК из кондиционной среды клеток В16; В16_с-внДНК – внДНК мышей с метастатической меланомой В16; NET – нейтрофильные внеклеточные ловушки.

* Адресат для корреспонденции.

клетки, в пуле внДНК анализируют геномный и эпигеномный профили, что позволяет оценить опухолевую нагрузку и скорректировать лечение [3]. Анализ соотношения мутантных фрагментов онкогенов, ретротранспозонов и мобильных генетических элементов (МГЭ), изменения метилирования внДНК с успехом применяют в клинических и преклинических исследованиях [4–6].

Несмотря на то что предпринимаются активные попытки исследовать состав внДНК, выполнено не так много исследований, посвященных функциональной роли внДНК. Относительно хорошо изученными являются так называемые нейтрофильные внеклеточные ловушки (NET), которые образуются из нейтрофилов при выбрасывании собственного геномного материала и содержимого гранул с формированием обширной сети, в том числе и в опухолевом окружении [7]. Образование NET в опухолевом окружении провоцирует рост опухоли и ее инвазию [8]. Для некоторых типов опухолевых клеток показано наличие рецептора CCDC25, селективно узнающего именно ДНК-составляющую NET по остаткам 8-ОН-дезоксигуанозина (8-ОНdG) и активирующего миграцию опухолевых клеток по пути ILK-PARVB [9].

Некоторые исследователи предполагают, что циркулирующая внДНК может участвовать в горизонтальном переносе, проникая в здоровые клетки организма и вызывая в них изменения, приводящие к формированию опухолевого микроокружения, преметастатической ниши и метастазов [10]. В области изучения эффектов опухолеспецифической внДНК на развитие патологических процессов выполнено лишь несколько пионерских работ [11–13]. Была обнаружена способность опухолеспецифической внДНК, полученной от пациентов с колоректальным раком, проникать в фибробласты мыши [11]. Была показана способность внДНК и хроматина из сыворотки крови пациентов с различными типами рака при проникновении в клетку попадать в ядро и интегрироваться в геном клетки-реципиента [13]. В недавней работе Souza et al. [14] показано, что внДНК из крови больных раком предстательной железы поглощалась клетками неопухолевых линий предстательной железы (RWPE-1 и PNT-2), что приводило к изменению экспрессии ряда генов и миРНК, связанных с онкогенезом, и усилению миграционных свойств клеток. В наших недавних работах было обнаружено, что снижение концентрации опухолеспецифической внДНК под действием ДНКазы I в сыворотке крови мышей-опухоленосителей

с различными метастатическими формами опухолей коррелировало с уменьшением первичного опухолевого узла и снижением количества метастазов, что говорит о функциональной значимости внДНК в опухолевой прогрессии [15–17]. Стоит отметить, что внДНК является компонентом опухолевого окружения, постоянно присутствующим в высокой концентрации и потенциально влияющим как на сами опухолевые клетки, так и на клетки опухолевого микроокружения. Однако до сих пор нет работ, описывающих влияние внДНК на сами опухолевые клетки, несмотря на то что накоплены данные о возможности взаимодействия внДНК с их рецепторами [9]. Таким образом, изучение влияния внДНК на опухолевые клетки является актуальной задачей и может быть важным для раскрытия фундаментальных процессов онкогенеза.

Целью данной работы является изучение биологических эффектов, которые оказывает внДНК, выделенная из сыворотки крови мышей с метастатической меланомой B16, на клетки B16 *in vitro*. Показано, что внДНК способна проникать в клетки-реципиенты и вызывать в них активацию экспрессии внутриклеточных и секреторных ДНКаз, а также онкогенов *Fos* и *Ras*, являющихся триггерами множества сигнальных каскадов от блокировки апоптоза до усиления пролиферации. Несмотря на то что внДНК не влияла на жизнеспособность и миграционную активность клеток-реципиентов, вызванная внДНК активация экспрессии ДНКаз и онкогенов может вносить существенный вклад в процесс усиления онкогенных свойств опухолевых клеток.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Опухолевые клетки. Клетки меланомы B16-F10 (далее, клетки B16) были приобретены в Институте цитологии РАН (Санкт-Петербург, Россия). Клетки B16 инкубировали в среде DMEM («ThermoFisher Scientific», США) с 10%-ной эмбриональной телячьей сывороткой («ThermoFisher Scientific»), 1%-ным раствором антибиотика-антимикотика (100 ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 0,25 мкг/мл амфотерицина; «ThermoFisher Scientific») в атмосфере 5% CO₂ при 37 °C (стандартные условия) и регулярно пассировали для поддержания экспоненциального роста.

Мыши. В работе использовали 10–14-недельных мышей-самцов линии C57Bl/6 (далее C57Bl) развода вивария ИХБФМ СО РАН

(Новосибирск, Россия). К началу эксперимента масса животного (mean $\pm$ SD) составляла $20,0 \pm 1,5$ г. Животных содержали по 10 особей в клетке в хорошо освещенном помещении. Мыши имели свободный доступ к еде и воде.

Опухолевая модель. Для формирования метастатической модели меланомы B16 суспензию клеток меланомы B16 ($0,5 \times 10^6$ клеток на мл) в 0,2 мл физиологического раствора (0,9%-ный водный раствор хлорида натрия) внутривенно вводили мышам. На 21-е сутки после введения опухолевых клеток прижизненно собирали кровь из ретро-орбитального синуса, мышей подвергали эвтаназии путем дислокации шейных позвонков. Легкие собирали и фиксировали в 10%-ном формалине (pH 7,0; «БиоВитрум», Россия) для последующего патоморфологического исследования. Число поверхностных метастазов в легких подсчитывали с помощью бинокуляра.

Получение кондиционной среды. Клетки B16 инкубировали в бессывороточной среде DMEM в стандартных условиях в течение 24 ч. Среду собирали и использовали для выделения внДНК.

Получение сыворотки крови. Образцы крови здоровых мышей (0,2 мл) брали из ретро-орбитального синуса. Сыворотку из образцов крови здоровых мышей и мышей с метастатической меланомой B16 получали методом формирования тромба путем инкубации при 37 °C в течение 30 мин с последующей инкубацией при 4 °C в течение ночи. Тромб извлекали и сыворотку центрифугировали (1500 g, 4 °C, 20 мин). Образцы сывороток хранили при –70 °C.

Выделение внДНК. ВнДНК из кондиционной среды (B16_{CM}-внДНК), сыворотки крови здоровых мышей (h-внДНК) и мышей с метастатической меланомой B16 (B16_S-внДНК) выделяли экстракцией фенолом/хлороформом (1/1; v/v) с последующим концентрированием методом обратной сорбции на силикатном сорбенте с помощью QI Aquick Gel Extraction kit («Qiagen», США) [17]. Чистоту выделенной ДНК оценивали с помощью NanoDrop® ND-1000 («ThermoFisher Scientific»), концентрацию измеряли с помощью Qubit™ fluorimeter («Invitrogen», США) и Quant-iT™ dsDNA HS Assa kit («ThermoFisher Scientific»).

Выделение суммарной ДНК из клеток B16 (B16-ДНК). С клеток B16 собирали среду, клетки открепляли 0,25%-ным раствором трипсина в ЭДТА, промывали PBS, осаждали центрифугированием при 300 g в течение 5 мин. Клеточный осадок обрабатывали 0,25%-ным раствором трипсина в ЭДТА и центрифугиро-

вали при 350 g в течение 20 мин при 4 °C, после чего супернатант удаляли. Клетки лизировали в 600 мкл раствора, содержащего 100 mM Tris-HCl (pH 8,0), 5 mM ЭДТА; 200 mM NaCl; 0,2% SDS и 10 нг/мл протеиназы К в течение 4 ч при 65 °C при постоянном перемешивании. Далее ДНК выделяли смесью фенол/хлороформ (1/1; v/v), как описано выше, и осаждали 96%-ным этанолом в присутствии 0,3 M ацетата натрия при –20 °C в течение 18 ч. ДНК отделяли центрифугированием, осадок промывали 80%-ным этанолом, высушивали, растворяли в воде и хранили при –20 °C. Концентрацию ДНК определяли с помощью Qubit™ fluorimeter и Quant-iT™ dsDNA HS Assa kit.

Исследование влияния внДНК на клетки меланомы B16. Клетки B16 высаживали в бессывороточной среде DMEM в 24-луночный планшет в плотности $0,5 \times 10^6$ клеток на лунку, чтобы через 12 ч клеточная культура достигла состояния 95%-ного конфлюэнтного монослоя. Через 24 ч среду заменяли на свежую бессывороточную среду DMEM, добавляли h-внДНК или B16_S-внДНК до концентрации 100 нг/мл и инкубировали в стандартных условиях в течение 24 ч. Клетки собирали, из одной части клеточного осадка выделяли суммарную ДНК экстракцией фенолом/хлороформом с последующим осаждением этанолом, как описано выше. Из второй части клеточного осадка выделяли РНК с помощью Trizol («ThermoFisher Scientific»), согласно стандартному протоколу. Качество и концентрацию выделенной РНК оценивали с помощью NanoDrop® ND-1000, качество и концентрацию ДНК оценивали с помощью Qubit™ fluorimeter и Quant-iT™ dsDNA HS Assa kit.

Определение количества последовательностей (представленности) МГЭ и онкогенов во внДНК с помощью qPCR. Количество последовательностей МГЭ и онкогенов в составе B16-ДНК, B16_{CM}-внДНК, h-внДНК и B16_S-внДНК определяли с помощью qPCR. Амплификацию проводили в реакционной смеси объемом 20 мкл, содержащей 0,1–0,5 нг ДНК, SYBR-Green-containing Bio Master CorHS-qPCR («Биолаб-микс», Россия) и по 0,6 мкМ прямого и обратного специфических праймеров к МГЭ (*B1_mus2*, *L1td1*) и онкогенам (*Braf*, *Hmga2*, *Myc*, *Fos*, *Jun*, *Ras*, *P53*) (табл. 1). Условия реакции: 95 °C – 6 мин; 95 °C – 15 с, 60 °C – 20 с, 70 °C – 60 с, 50 циклов. В качестве референса использовался *Gapdh*.

Определение уровня экспрессии МГЭ, ДНКаз и онкогенов с помощью RT-qPCR. Для приготовления кДНК использовали реакционную смесь объемом 40 мкл, содержащую 2 мкг

Таблица 1. Последовательность праймеров, использованных в работе

Наименование	Последовательности праймеров 5'→3'	
	прямой праймер	обратный праймер
Праймеры для qPCR		
<i>B1_mus2</i>	GAGACAGGCGGATTTCTGAGT	TGTAGCCCTGGCTGTCCT
<i>L1td1</i>	GCCAGGTATCTGTGCATCTT	ACTCTAGCTCTCTCCTGAGTTT
<i>Braf</i>	GCTCACAGACTAGGCGTAAAT	GGAGAGACAAGTGCTGTAGAAG
<i>Hmga2</i>	CCTTCACAGTCCCAGGTTTAG	AAGAGAGCTTGTGGGCTTATC
<i>Myc</i>	CGACTACGACTCCGTACAGC	CCAGATATCCTCACTGGGCG
<i>Fos</i>	GAGAATCCGAAGGGAAGGAATA	GTAGGTGAAGACGAAGGAAGAC
<i>Jun</i>	GTTGAGCTCAGGCTGGATAAG	CTGTGCGAACTGGTATGAGTATAG
<i>Ras</i>	GCTCTGTGTCCATCTACTCATC	AGCCATCAAAGTCTCCTTATCC
<i>P53</i>	CAGTCTACTTCCC GCCATAAA	CAGCAGAGACCTGACAACATATC
<i>Gapdh</i>	AATGGTGAAGGTCGGTGTG	ACAAGCTTCCCATTCTCGG
Праймеры для RT-qPCR		
<i>L1td1 Orf1</i>	GAACCAAGACCACTACCATCA	CCCTGGACTGGGCGAAGT
<i>L1td1 Orf2</i>	GCGGTTTCCTCAGAAAATTGG	TGCCCAGGAGAGGTATTGCT
<i>Dnase1l3</i>	TATCCACACCTCACTCCTATCC	CAACAGAGTCAAGGGCCATAA
<i>Dffa</i>	TGCCTTGAAGTGGGACATAAA	GCTGAGGGTGTCTACCAATAAC
<i>Dffb</i>	CAGGAATAAGTCGGGCTATCTG	CGGTGCGCTTCTTCTCTATTA
<i>Endog</i>	GCTCCTTCACTCTGTGCTAAC	CCACGTGGTTCTTCCCAATAA
<i>Fos</i>	GAGAATCCGAAGGGAAGGAATA	GTAGGTGAAGACGAAGGAAGAC
<i>Jun</i>	GTTGAGCTCAGGCTGGATAAG	CTGTGCGAACTGGTATGAGTATAG
<i>Myc</i>	CGACTACGACTCCGTACAGC	CCAGATATCCTCACTGGGCG
<i>Ras</i>	CAAGATGGATTGCACGCAGG	GCAGCCGATTGTCTGTTGTG
β -актин	AGCCATGTACGTAGCCATCCA	TCTCCGGAGTCCATCACAATG

суммарной клеточной РНК, 5 × ОТ-буфер mix («Биолабмикс»), 100 ед. обратной транскриптазы MMuLV-RH («Биолабмикс») и 0,05 мкМ праймера dT15. Реакцию обратной транскрипции проводили в следующем режиме: 42 °C – 1 ч, 70 °C – 10 мин.

Реакционная смесь для qPCR объемом 25 мкл содержала 0,1–0,5 нг кДНК, БиоМастер HS-qPCR SYBR Blue («Биолабмикс») и по 0,6 мкМ прямого и обратного специфических

праймеров к МГЭ (*L1td1 Orf1*, *L1td1 Orf2*), ДНКазам (*Dnase1l3*, *Dffa*, *Dffb*, *Endog*) и онкогенам (*Fos*, *Jun*, *Myc*, *Ras*) (табл. 1). Условия реакции: 95 °C – 6 мин; 95 °C – 15 с, 60 °C – 20 с, 70 °C – 60 с, 45 циклов. В качестве референса использовался β -актин.

Исследование влияния виДНК на жизнеспособность, миграционную активность и апоптоз клеток В16. МТТ-тест. Клетки высаживали в 96-луночный планшет по $1,5 \times 10^4$ клеток на

лунку в бессывороточной среде DMEM. Через 24 ч среду заменяли на свежую бессывороточную среду DMEM, добавляли h-внДНК или B16_s-внДНК до концентраций 5–100 нг/мл и инкубировали в стандартных условиях в течение 24 ч. Далее к клеткам добавляли раствор МТТ до концентрации 0,5 мг/мл, инкубировали в течение 3 ч и анализировали, как описано ранее [18].

Scratch-тест. Клетки в бессывороточной среде DMEM высаживали в 6-луночный планшет в плотности $1,5 \times 10^6$ клеток на лунку, чтобы через 12 ч клеточная культура достигла состояния 90%-ного конфлюэнтного монослоя. В клеточном монослое наносили царапины шириной 0,5 мм носиком пипетки на 200 мкл, трижды промывали PBS, добавляли бессывороточную среду DMEM, h-внДНК или B16_s-внДНК до концентрации 100 нг/мл и инкубировали в стандартных условиях в течение 24 ч. Границы царапины маркировали и фотографировали зоны повреждения в течение суток с помощью микроскопа Zeiss Primo Vert («Zeiss», Германия). Скорость миграции клеток оценивали с помощью программного обеспечения ImageJ [17].

Апоптоз. Клетки B16 высаживали в бессывороточной среде DMEM в 24-луночный планшет в плотности $0,5 \times 10^6$ клеток на лунку. Через 12 ч среду заменяли на свежую бессывороточную среду DMEM, добавляли h-внДНК и B16_s-внДНК до концентрации 100 нг/мл и инкубировали в стандартных условиях в течение 24 ч. Анализ апоптоза проводили с использованием набора Annexin V-FITC («Abcam», Великобритания) в соответствии с протоколом производителя на проточном цитометре NovoCyte («ACEA Biosciences», США).

В качестве контроля для МТТ-теста, Scratch-теста и определения уровня апоптоза использовали клетки B16, инкубированные в бессывороточной среде DMEM в течение 24 ч.

Статистический анализ. Для статистической обработки данных использовали *t*-тест критерия Стьюдента и однофакторный дисперсионный анализ ANOVA с апостериорным критерием Тьюки (Tukey). Значение $p \leq 0,05$ отражало статистически достоверные отличия. Для статистического анализа использовали программу STATISTICA 10.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Получение и характеристика образцов внДНК из сыворотки крови. Мышам линии C57Bl внутривенно вводили клетки меланомы B16

(10^5 клеток/мышь), через 21 день проводили забор крови, выводили мышей из эксперимента и определяли количество поверхностных метастазов в легких. ВнДНК выделяли из сыворотки крови, как описано в разделе «Материалы и методы». Схема получения образцов внДНК показана на рис. 1, а. При внутривенном введении меланомы B16 развивается в виде множественных метастатических опухолевых узлов, в первую очередь в легочной ткани животных (рис. 1, б). На 21-е сутки развития опухоли количество поверхностных метастазов в среднем составило 50, однако при этом наблюдался разброс в количестве метастазов на особь от 25 до 150 (рис. 1, в).

Развитие опухолевого процесса (метастазы в легких) у мышей сопровождалось значительным повышением концентрации циркулирующих внДНК в сыворотке крови мышей-опухоленосителей (рис. 1, г). Так, медианное значение концентрации внДНК в сыворотке крови мышей-опухоленосителей составило 1000 нг/мл, а разброс значений варьировал от 100 до 2500 нг/мл (рис. 1, г). Медианное значение концентрации внДНК сыворотки крови у здоровых мышей было 35 нг/мл, а разброс значений варьировал от 0 до 150 нг/мл (рис. 1, г).

Для дальнейших экспериментов использовали сыворотки крови от мышей-опухоленосителей с количеством поверхностных метастазов в легких не менее 25 и концентрацией внДНК в сыворотке крови не менее 250 нг/мл, а также сыворотки крови здоровых мышей с концентрацией внДНК не менее 50 нг/мл. После выделения внДНК объединяли по группам. Таким образом, были получены объединенные препараты внДНК животных-опухоленосителей (B16_s-внДНК) и здоровых животных (h-внДНК). Также для сравнения состава фрагментов была выделена внДНК из кондиционной среды клеток B16 (B16_{CM}-внДНК) и суммарная ДНК клеток B16 (B16-ДНК).

Препараты внДНК были охарактеризованы по уровню представленности фрагментов онкогенов и МГЭ методом qPCR. В табл. 2 приведены данные по представленности фрагментов МГЭ и онкогенов в B16_{CM}-внДНК, h-внДНК и B16_s-внДНК. Уровень представленности фрагментов МГЭ и онкогенов в B16-ДНК был использован в качестве референса сравнения.

Видно, что последовательности МГЭ и онкогенов слабо представлены в h-внДНК по сравнению с их уровнями представленности в B16-ДНК. Составы B16_s-внДНК и B16_{CM}-внДНК были похожи по уровню представленности выбранных фрагментов: последовательности

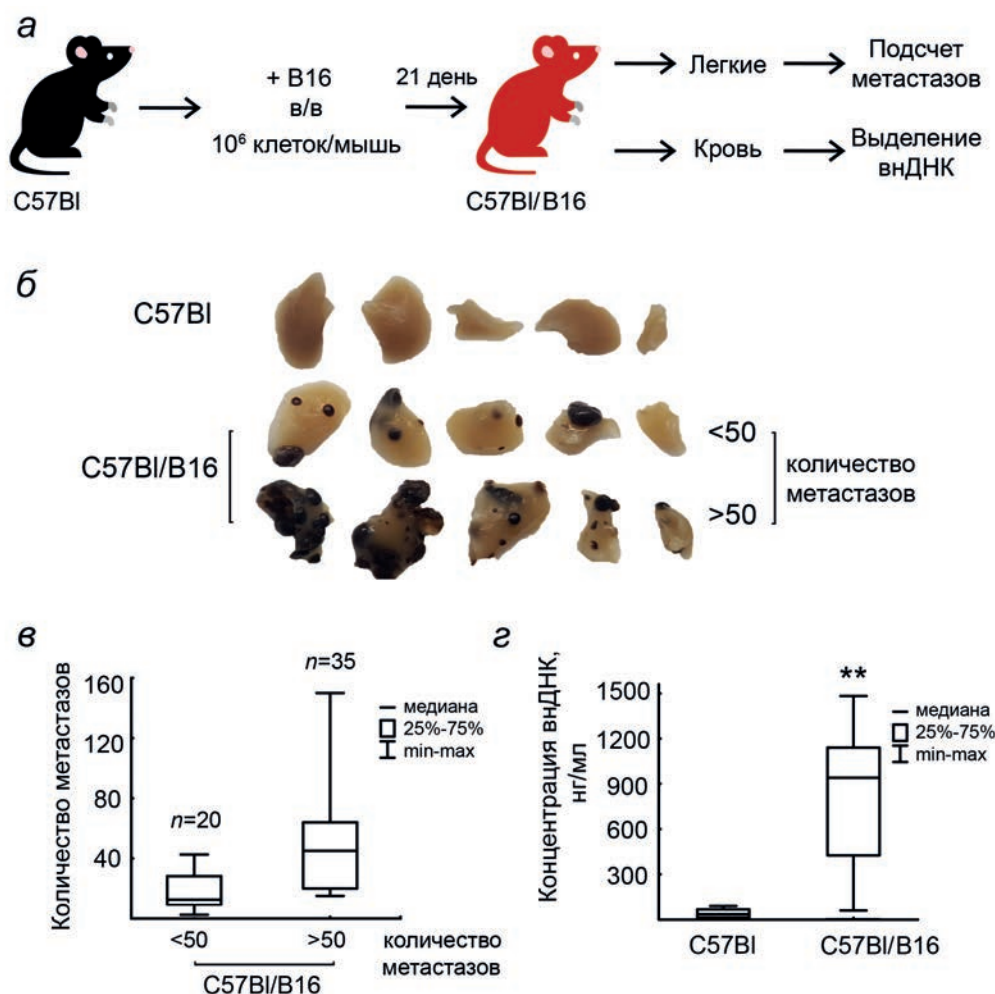


Рис. 1. Характеризация метастатической модели меланомы. *а* – Дизайн эксперимента. *б* – Легкие здоровых мышей и мышей-опухоленосителей с количеством поверхностных метастазов <50 и >50. *в* – Разброс среди мышей-опухоленосителей с количеством метастазов <50 ($n = 20$) и >50 ($n = 35$). *г* – Концентрация вДНК в сыворотке крови здоровых мышей и мышей-опухоленосителей с количеством метастазов >50 ($n = 35$). Данные проанализированы с использованием однофакторного анализа ANOVA с апостериорным критерием Тьюки и представлены в виде медианы, ** $p < 0,001$

Таблица 2. Представленность фрагментов МГЭ и онкогенов в вДНК сыворотки крови здоровых мышей, мышей с меланомой, геномной ДНК B16 и кондиционной среде клеток B16

Гены	h-вДНК	B16s-вДНК	B16cm-вДНК	B16-ДНК
<i>B1_mus1</i>	—	++	++	++
<i>B1_mus2</i>	—	++	++	++
<i>L1td1 Orf2</i>	—	++	++	++
<i>Braf</i>	—	—	—	—
<i>Hmga2</i>	—	—	—	—
<i>Jun</i>	—	—	—	—
<i>Myc</i>	—	++	++	+
<i>Ras</i>	—	+	++	+
<i>P53</i>	—	—	—	—

Примечание. Уровень представленности фрагментов онкогенов и МГЭ был определен с помощью qPCR. «—» – относительное содержание последовательностей менее 0,3 отн. ед.; «+» – 0,3–0,7 отн. ед.; «++» – более 0,7 отн. ед.; отн. ед. – относительные единицы, количество копий гена, нормированное на количество копий *Gapdh*.

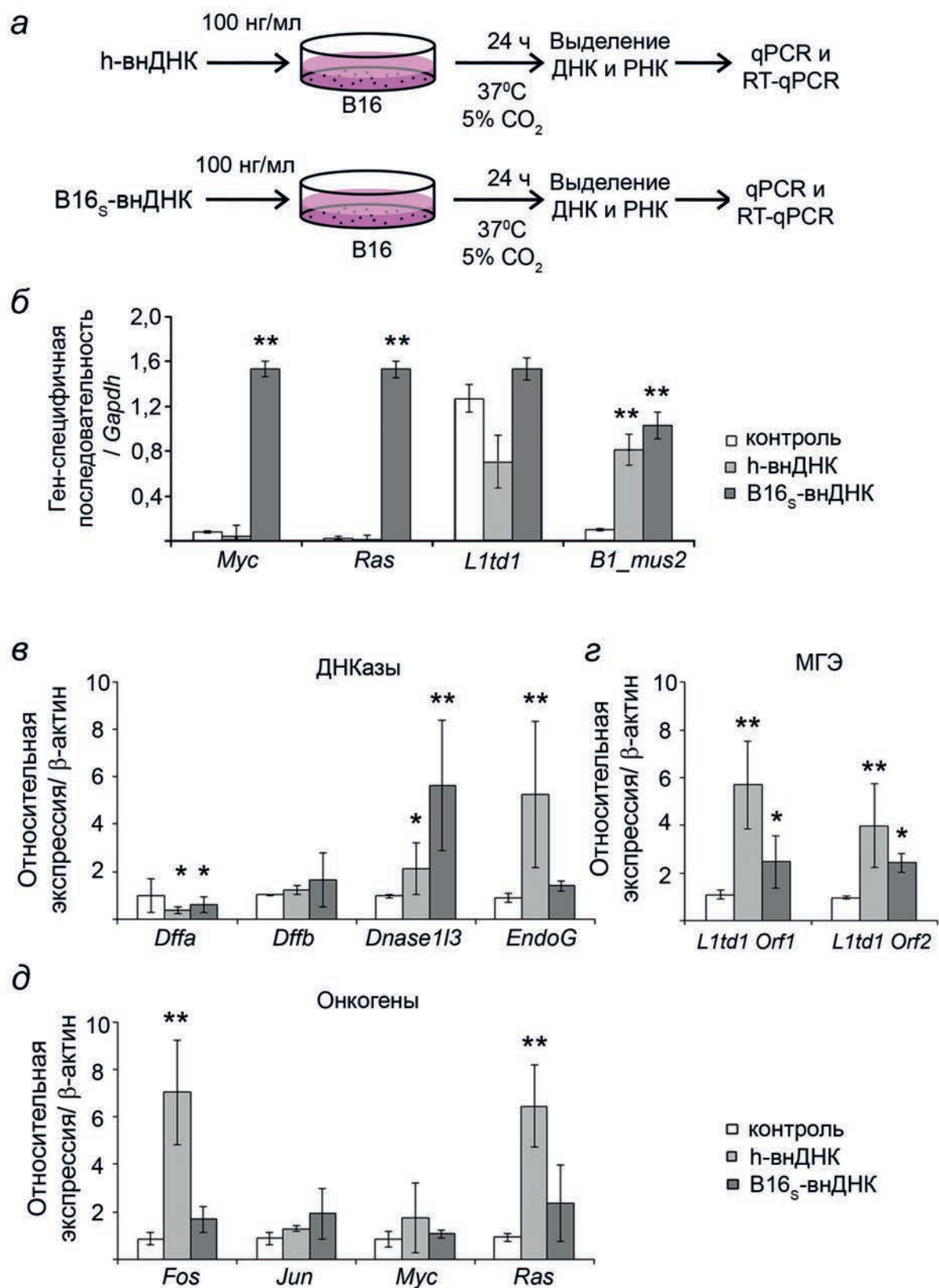


Рис. 2. Влияние B16_s-внДНК на свойства клеток меланомы B16. *а* – Схема эксперимента. *б* – Изменение представленности фрагментов *Myc*, *Ras*, *L1td1* и *B1_mus2* в клетках B16 после инкубации с B16_s-внДНК. Данные qPCR. В качестве референсного гена использовали *Gapdh*. *в–д* – Влияние B16_s-внДНК на уровни экспрессии ДНКаз (*в*), МГЭ (*г*) и онкогенов (*д*) в клетках B16. Данные RT-qPCR. В качестве референсного гена использовали β-актин. Контроль – интактные клетки. Данные анализировали с использованием критерия Стьюдента (*t*-тест) и представляли как среднее ± SEM; * *p* < 0,05; ** *p* < 0,001

генов *Hmga2*, *Braf*, *P53* и *Jun* детектировались слабо, последовательности *B1_mus1*, *B1_mus2*, *L1td1* *Orf2* и *Myс* были представлены на достаточно высоком уровне — более 0,7 относительных единиц (отн. ед.) (табл. 2). Отличия были обнаружены только для гена *Ras*, представленность фрагментов которого в кондиционной среде была выше как по сравнению с *B16*-ДНК, так и с *B16_s*-внДНК.

Изучение влияния *B16_s*-внДНК на свойства клеток меланомы *B16*. Для изучения влияния *B16_s*-внДНК на свойства клеток *B16* к клеткам в бессывороточной среде DMEM добавляли *h*-внДНК или *B16_s*-внДНК до концентрации 100 нг/мл и инкубировали в стандартных условиях в течение 24 ч. По окончании инкубации клетки собирали, выделяли суммарную ДНК и определяли представленность фрагментов онкогенов (*Myс*, *Ras*) и МГЭ (*B1_mus2*, *L1td1*) методом qPCR (рис. 2, а).

Из приведенных данных (рис. 2, б) видно, что *B16_s*-внДНК приводит к многократному увеличению представленности фрагментов обоих онкогенов и *B1_mus2*. *h*-внДНК вызывала в клетках меланомы *B16* достоверное увеличение представленности только фрагментов *B1_mus2* и не оказывала влияния на представленность онкогенов и фрагментов *L1td1* (рис. 2, б). Ни *h*-внДНК, ни *B16_s*-внДНК не вызывали в клетках *B16* достоверного изменения представленности фрагментов *L1td1*. Таким образом, можно заключить, что внДНК способна проникать в клетки меланомы *B16*.

Помимо представленности фрагментов онкогенов и МГЭ для оценки изменений в клетках-реципиентах после их инкубации с *B16_s*-внДНК, оценивали изменение уровней мРНК ряда ключевых ДНКаз (*Dffa*, *Dffb*, *Dnase1L3*, *EndoG*), являющихся маркерами первичного ответа клетки на присутствие экзогенной ДНК, онкогенов (*Ras*, *Myс*, *Fos*, *Jun*), которые являются триггерами внутриклеточных процессов и основными показателями клеточного метаболизма, и LINE-элемента *L1td1* (*Orf1*, *Orf2*), указывающего на активацию/подавление ретротранспозиции (рис. 2, в).

Оказалось, что *h*-внДНК в 2 раза повышает уровень мРНК *Dnase1L3*, кодирующего внутриклеточную секреторную ДНКазу, и вызывает 5-кратное повышение уровня мРНК *EndoG*, кодирующего ДНКазу, участвующую преимущественно в негативной регуляции апоптоза и ограничивающую экспрессию другой секреторной ДНКазы — ДНКазы I (рис. 2, в). При этом уровень экспрессии мРНК *Dffb*, кодирующей апоптотическую ДНКазу, не менялся. Действие *B16_s*-внДНК на клетки мелано-

мы *B16* значительно отличается от действия *h*-внДНК: для *B16_s*-внДНК наблюдается значительное увеличение уровня экспрессии *Dnase1L3* по сравнению с интактными клетками (контролем) и незначительное статистически недостоверное увеличение экспрессии мРНК *Dffb* и *EndoG* (рис. 2, в). Интересно, что внДНК обоих типов привели к достоверному снижению уровня экспрессии мРНК *Dffa*.

И *B16_s*-внДНК и *h*-внДНК приводили к увеличению экспрессии мРНК *L1td1* (*Orf1* и *Orf2*), однако более выраженный эффект был отмечен для *h*-внДНК (рис. 2, г). Следует отметить, что *h*-внДНК вызывала более значимое изменение экспрессии генов в клетках меланомы *B16*, чем *B16_s*-внДНК: *h*-внДНК вызывала 4-кратное повышение уровня мРНК онкогенов *Fos* и *Ras* по сравнению с контролем (рис. 2, д), тогда как *B16_s*-внДНК вызывала слабое статистически недостоверное повышение экспрессии всех четырех исследованных онкогенов (рис. 2, д).

Одной из задач данного исследования было изучить, как внДНК опухолевого происхождения влияет на жизнеспособность и миграционную активность опухолевых клеток, и способна ли внДНК после попадания в опухолевые клетки запускать в них апоптоз *in vitro*. Для определения уровня апоптоза клетки меланомы *B16* инкубировали в присутствии *B16_s*-внДНК в концентрации 100 нг/мл в течение 24 ч, а затем окрашивали аннексином V-FITC/PI и анализировали с помощью проточной цитометрии (рис. 3, а). Жизнеспособность клеток *B16* определяли с помощью МТТ-теста после их инкубации в присутствии *h*-внДНК или *B16_s*-внДНК в концентрации 10–100 нг/мл в течение 24 ч (рис. 3, б). Влияние внДНК на миграцию клеток *B16* исследовали методом «scratch»-теста: клетки *B16* инкубировали в присутствии *h*-внДНК или *B16_s*-внДНК в концентрации 100 нг/мл и тестировали скорость зарастания ими царапины, формируемой в монослое (рис 3, в и г).

Оказалось, что ни *h*-внДНК, ни *B16_s*-внДНК не влияют на уровень апоптоза, жизнеспособность и миграционные свойства клеток *B16* (рис. 3). Таким образом, аутологичная внДНК не меняла макросвойства клеток меланомы ни в плане усиления проопухолевой активности (пролиферация, миграция), ни в плане антиопухолевой активности (апоптоз).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящий момент накоплено большое количество данных о составе циркулирующих

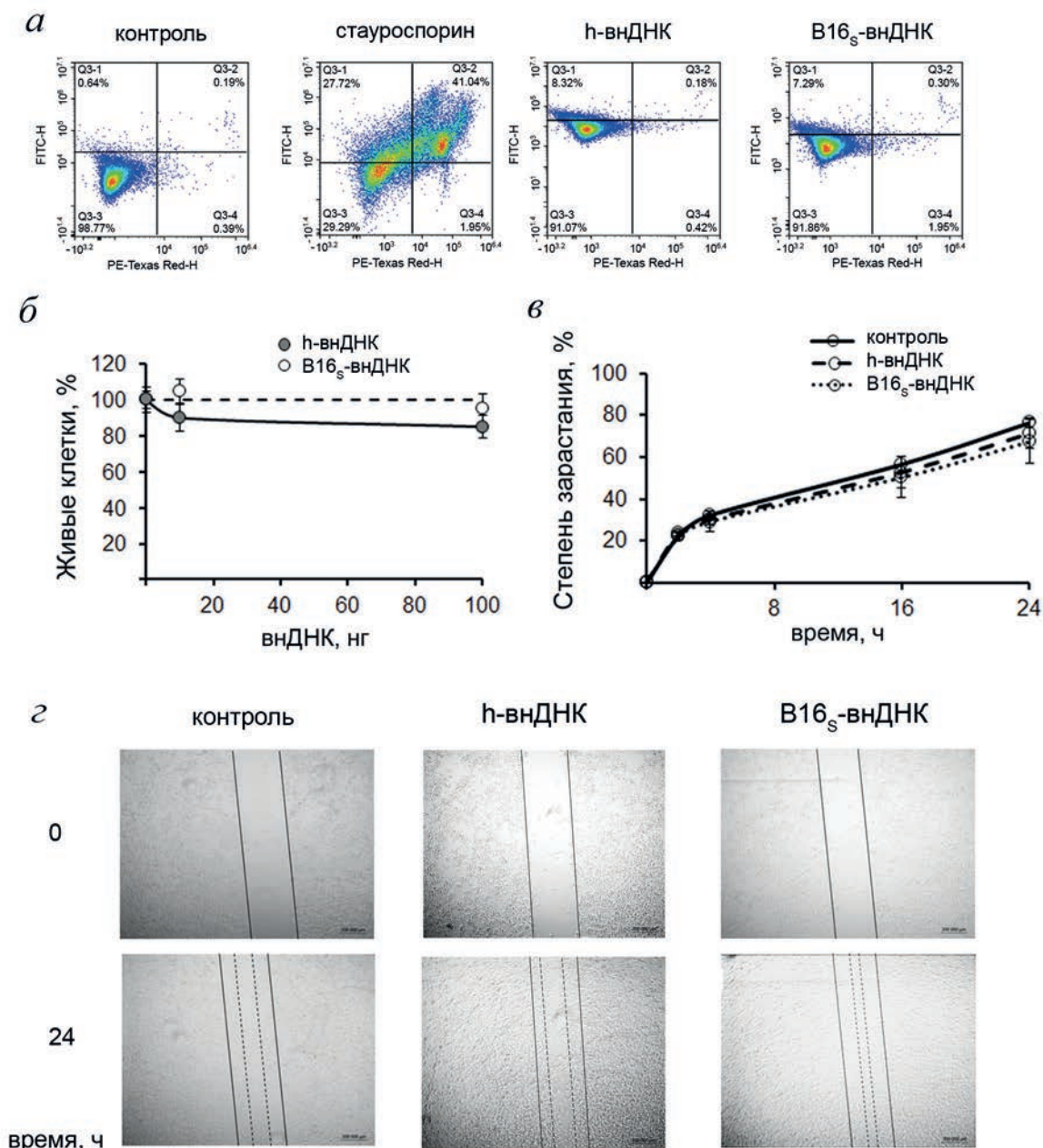


Рис. 3. Влияние B16_s-внДНК на апоптоз, жизнеспособность и миграционную активность клеток меланомы B16. **а** – Влияние внДНК на способность запускать апоптоз клеток B16. Результаты проточной цитометрии. Q3-1 – аннексин V-FITC⁻/PI⁺, некроз; Q3-2 – аннексин V-FITC⁺/PI⁺, поздний апоптоз; Q3-3 – аннексин V-FITC⁻/PI⁻, живые клетки; Q3-4 – аннексин V-FITC⁺/PI⁻, ранний апоптоз. Положительный контроль позднего апоптоза – клетки B16, обработанные стауроспорином (0,1 мкг/1 млн клеток). **б** – Влияние внДНК на жизнеспособность клеток B16. Данные МТТ-теста. Данные представлены как среднее ± SEM. **в** – Степень зарастания царапины клетками B16 через 24 ч инкубации с внДНК. Данные Scratch-теста. Сплошная линия – границы царапины в момент времени 0; пунктирные линии – граница клеточного фронта через 24 ч. Контроль – интактные клетки B16 без обработки

внДНК в крови высших организмов при различных патологиях, но биологические функции внДНК до сих пор активно изучаются. В клинической практике предпринимаются попытки использовать характеристики внДНК для ранней диагностики онкологических заболеваний [2]. Углубленное исследование характеристик внДНК позволило поставить вопрос

о возможной роли внДНК в канцерогенезе, что подтверждается некоторыми экспериментальными данными [11, 13, 14, 19]. В нескольких работах было сделано предположение, что внДНК опухолевого происхождения, в состав которой в том числе входят и фрагменты онкогенов, может вести себя подобно онковирусам, что открывает альтернативный путь

метастазирования [11, 13, 14]. Открытие ДНК-содержащих микровезикул и полученные доказательства горизонтального переноса ДНК для многих клеточных линий и организмов позволили укрепить эту гипотезу [19]. Несмотря на то что накоплены некоторые данные о функциональном воздействии внДНК опухолевого происхождения на здоровые клетки, отсутствуют данные о влиянии такой внДНК на сами опухолевые клетки.

Целью данной работы было исследование влияния циркулирующих B16_s-внДНК на опухолевые клетки для понимания механизмов, опосредующих участие циркулирующих опухолеспецифических внДНК в процессах онкотрансформации. В нашей работе в качестве внДНК опухолевого происхождения была использована B16_s-внДНК из сыворотки крови мышей с метастатической меланомой B16, для которой характерно образование большого числа метастазов в легких и высокая концентрация внДНК в сыворотке крови. Принимая во внимание, что клетки опухоли также испытывают давление от внДНК, генерированных здоровыми клетками, особенно на ранних стадиях развития опухоли, h-внДНК также была использована в экспериментах.

Нами было обнаружено, что состав B16_s-внДНК значительно отличается от состава h-внДНК и по представленности последовательностей онкогенов и МГЭ схож как с суммарной B16-ДНК, так и с B16_{см}-внДНК. Эти результаты подтверждают, что внДНК при метастатической меланоме имеет преимущественно опухолевое происхождение и отражает состав геномной ДНК клеток B16, что позволяет рассматривать данную внДНК как опухолеспецифичную. Это согласуется с тем, что геном опухолевых клеток отличается от генома нормальных клеток, и во многих случаях измененный профиль внДНК отражает превалирование в этом пуле ДНК из опухолевых клеток над ДНК из нормальных клеток [20].

Интересно, что ни B16_s-внДНК, ни h-внДНК не оказывали никаких эффектов как с точки зрения усиления проопухолевой активности, так и противоопухолевой активности. В работе Mitra et al. [13] было показано, что внДНК из крови пациентов с опухолями способна проникать в ядра клеток и адгезироваться хроматином, что приводило к двуцепочечным разрывам в ДНК и, как следствие, запуску ранних стадий апоптоза в клетках-реципиентах. Тем не менее следует отметить, что в работе Mitra et al. [13] использовали внДНК человека, а в качестве клеток-реципиентов — фибробласты NIH3T3 мыши, поэтому индукция

апоптоза может объясняться видовым конфликтом [21, 22]. И в данном исследовании, и в работе Mitra et al. [13] использовались одни и те же концентрации внДНК (100 нг/мл). Тем не менее наши данные показали, что концентрации внДНК в крови животных-опухоленосителей могут достигать 1500 нг/мл, и поэтому в условиях организма постоянно пополняющийся пул опухолеспецифической внДНК в высоких концентрациях может вызывать более выраженные апоптотические сигналы, сопровождающиеся усилением или ослаблением инвазивных свойств опухолевых клеток.

Тем не менее, несмотря на отсутствие эффектов внДНК на жизнеспособность, апоптоз и миграцию клеток меланомы B16, было обнаружено, что как B16_s-внДНК, так h-внДНК вызывают изменение уровней мРНК ряда ключевых генов: ДНКаз, как генов первичного ответа на присутствие экзогенной ДНК; онкогенов, которые являются триггерами внутриклеточных каскадов, в том числе и каскадов, опосредующих онкотрансформацию [23]; и ретротранспозона *L1td1*.

Было показано, что ни один тип внДНК не вызывал повышения уровня экспрессии мРНК *Dffb*, кодирующего проапоптотическую ДНКазу, что может быть признаком отсутствия токсических эффектов внДНК. Тем не менее оба типа внДНК вызывали снижение уровня экспрессии мРНК ДНКазы *Dffa*, которая является специфическим ингибитором ДНКазы *Dffb*. В норме оба белка находятся в форме неактивного гетеродимера, и при возникновении внешней угрозы в виде чужеродной ДНК либо при увеличении общей концентрации внутриклеточной ДНК происходит диссоциация гетеродимера с высвобождением активной субъединицы *Dffb* [24]. Для подавления избыточного функционирования *Dffb* требуется новая порция *Dffa*, однако снижение экспрессии мРНК *Dffa*, кодирующего белок-ингибитор, говорит о повышенной готовности клетки к расщеплению ДНК [25].

B16_s-внДНК вызывала очень умеренное повышение уровня мРНК гена, кодирующего EndoG, нуклеазу широкого спектра действия, негативного регулятора апоптоза и участника процессов репарации [26]. В норме EndoG локализуется в митохондриях и только при разрушении митохондрий при апоптозе попадает в ядро, где может приводить к разрушению хроматина, активации других ДНКаз и усилению апоптотического каскада [27]. Полученные нами данные указывают на то, что повышение уровня мРНК *EndoG* может коррелировать с ограничением запуска апоптоза.

Следует отметить, что под действием h-внДНК уровень мРНК *EndoG* возрастал в значительно большей степени, чем под действием B16_s-внДНК.

B16_s-внДНК вызывала значительное повышение уровня мРНК *Dnase113*, кодирующего секретируемую ДНКазу. *Dnase113* способна расщеплять ДНК в ДНК-белковых комплексах и является мощным инструментом защиты клеток от чужеродной ДНК либо собственной ДНК при увеличении ее концентрации вследствие обменных процессов в организме [28, 29]. Таким образом, инкубация клеток в присутствии внДНК приводит к включению механизмов защиты клетки от избыточной ДНК.

При анализе влияния B16_s-внДНК на уровни онкогенов в клетках B16 было обнаружено лишь слабое повышение уровня мРНК онкогенов *Fos*, *Jun* (кодирует регуляторы транскрипции) и *Ras* (кодирует белок-мессенджер, участвующий во многих сигнальных каскадах). При этом h-внДНК приводила к значительному (в 4 раза) повышению уровня мРНК онкогенов *Fos* и *Ras* относительно контроля, а повышения экспрессии *Jun* не наблюдалось [30].

Белки *Jun* и *Fos* склонны к димеризации, и в норме существуют либо димеры *Jun–Jun* и *Fos–Fos*, обладающие относительно низкой способностью связываться с ДНК [31], либо смешанные димеры *Jun–Fos*, более стабильные и обладающие более сильной ДНК-связывающей активностью по сравнению с гомодимерами [31]. Наблюдаемое повышение уровня мРНК *Fos* свидетельствует об активации клеточных каскадов, что может приводить к стимуляции пролиферации и инвазии опухолевых клеток. Наблюдаемое увеличение уровня мРНК *Ras* (ген малой ГТФазы, являющейся промежуточным звеном в цепи передачи сигналов во многих клеточных каскадах) также является признаком активации клеточных каскадов, приводящей к усилению онкотрансформации [32].

Интересным результатом является обнаруженная способность h-внДНК вызывать на уровне мРНК активацию в опухолевых клетках сигнальных путей, усиливающих онкотрансформацию в значительно большей степени, чем B16_s-внДНК. Опухолеспецифическая циркулирующая внДНК отличается от условно нормальной циркулирующей внДНК измененным статусом метилирования и может активировать сигнальные пути через внутриклеточные TLR9-рецепторы, узнающие, как правило, неметилированные CpG-мотивы [33]. Кроме того, GC-состав опухолеспецифической внДНК от-

личается от условно нормальной циркулирующей внДНК, как правило, в сторону увеличения представленности GC-богатых последовательностей, что также может приводить к изменению TLR9-сигналинга [34]. Опухолеспецифическая внДНК может характеризоваться повышенной представленностью 8-oxodG, что влияет на ее узнавание рецепторами, и, соответственно, на запускаемые ею сигнальные пути в клетке [35]. Таким образом, уровень активации внутриклеточных сигналов в опухолевых клетках под действием опухолеспецифической ДНК, которая является для клеток B16 аутологичной, и условно нормальной ДНК различается.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Суммируя все вышесказанное, можно заключить, что как внДНК из сыворотки крови здоровых мышей, так и внДНК из сыворотки крови мышей с метастатической меланомой B16 при воздействии на клетки B16 вызывает выраженный ответ: увеличение экспрессии внутриклеточных и секретируемых ДНКаз, которые не только защищают клетку от избыточной концентрации ДНК, но являются регуляторами процессов апоптоза. ВнДНК здоровых мышей вызывала увеличение уровня мРНК онкогенов *Fos* и *Ras*, являющихся триггерами большого числа сигнальных каскадов от блокировки апоптоза до усиления пролиферации опухолевых клеток. Активация процессов транскрипции и внутриклеточного сигналинга в опухолевых клетках под действием внДНК обоих типов, продемонстрированная *in vitro*, может усилить чувствительность опухолевых клеток к другим стимулам (гистонам, низкомолекулярным медиаторам, факторам роста и т.д.), которые циркулируют в кровотоке вместе с внДНК *in vivo* [36]. В итоге общая мобилизация клеточных процессов может способствовать пролиферации опухолевых клеток, формированию опухолевого микроокружения, росту опухолевого узла, усилению миграции и в конечном итоге усилению онкогенеза, формированию преметастатической ниши и метастазированию.

Вклад авторов. М.Н.Л., З.М.А. — идея и руководство исследованием; Ф.А.А., А.Л.А., С.А.В., С.И.А. — проведение исследований; А.Л.А., М.Н.Л. — обсуждение результатов экспериментов с согласованием со всеми авторами; Ф.А.А., А.Л.А., М.Н.Л. — написание рукописи; З.М.А. — редактирование рукописи.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 22-14-00289).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Все процедуры с животными проводились в соответствии

с рекомендациями по правильному использованию и уходу за лабораторными животными (Директива ЕСС 2010/63/ЕС). Все эксперименты на животных были одобрены и выполнены по рекомендациям биоэтического комитета ФИЦ «Институт цитологии и генетики СО РАН» (Новосибирск, Россия).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Oellerich, M., Schütz, E., Beck, J., Kanzow, P., Plowman, P. N., Weiss, G. J., and Walson, P. D. (2017) Using circulating cell-free DNA to monitor personalized cancer therapy, *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.*, **54**, 205-218, doi: 10.1080/10408363.2017.1299683.
- Balla, A., Bhak, J., and Biró, O. (2022) The application of circulating tumor cell and cell-free DNA liquid biopsies in ovarian cancer, *Mol. Cell Probes*, **66**, 101871, doi: 10.1016/j.mcp.2022.101871.
- Otandault, A., Anker, P., Al Amir Dache, Z., Guillaumon, V., Meddeb, R., Pastor, B., Pisareva, E., Sanchez, C., Tanos, R., Tusch, G., Schwarzenbach, H., and Thierry, A. R. (2019) Recent advances in circulating nucleic acids in oncology, *Ann. Oncol.*, **30**, 374-384, doi: 10.1093/annonc/mdz031.
- Thierry, A. R., El Messaoudi, S., Mollevi, C., Raoul, J. L., Guimbaud, R., Pezet, D., Artru, P., Assenat, E., Borg, C., Mathonnet, M., De La Fouchardière, C., Bouché, O., Gavaille, C., Fiess, C., Auzemery, B., Meddeb, R., Lopez-Crapez, E., Sanchez, C., Pastor, B., and Ychou, M. (2017) Clinical utility of circulating DNA analysis for rapid detection of actionable mutations to select metastatic colorectal patients for anti-EGFR treatment, *Ann. Oncol.*, **28**, 2149-2159, doi: 10.1093/annonc/mdx330.
- Bachet, J. B., Bouché, O., Taieb, J., Dubreuil, O., Garcia, M. L., Meurisse, A., Normand, C., Gornet, J. M., Artru, P., Louafi, S., Bonnetain, F., Thiriot-Bidault, A., Baumgaertner, I., Coriat, R., Tougeron, D., Lecomte, T., Mary, F., Aparicio, T., Marthey, L., Taly, V., Blons, H., Vernerey, D., and Laurent-Puig, P. (2018) RAS mutation analysis in circulating tumor DNA from patients with metastatic colorectal cancer: the AGEO RASANC prospective multicenter study, *Ann. Oncol.*, **29**, 1211-1219, doi: 10.1093/annonc/mdy061.
- Keller, L., Guibert, N., Casanova, A., Brayer, S., Farella, M., Delaunay, M., Gilhodes, J., Martin, E., Balagué, G., Favre, G., Pradines, A., and Meyer, N. (2019) Early circulating tumour DNA variations predict tumour response in melanoma patients treated with immunotherapy, *Acta Derm. Venereol.*, **99**, 206-210, doi: 10.2340/00015555-3080.
- Poli, V., and Zanoni, I. (2022) Neutrophil intrinsic and extrinsic regulation of NETosis in health and disease, *Trends Microbiol.*, **31**, 280-293, doi: 10.1016/j.tim.2022.10.002.
- Sounbali, K., Mironova, N., and Alekseeva, L. (2022) Diverse neutrophil functions in cancer and promising neutrophil-based cancer therapies, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 15827, doi: 10.3390/ijms232415827.
- Yang, L., Liu, Q., Zhang, X., Liu, X., Zhou, B., Chen, J., Huang, D., Li, J., Li, H., Chen, F., Liu, J., Xing, Y., Chen, X., Su, S., and Song, E. (2020) DNA of neutrophil extracellular traps promotes cancer metastasis via CCDC25, *Nature*, **583**, 133-138, doi: 10.1038/s41586-020-2394-6.
- García-Olmo, D. C., and García-Olmo, D. (2013) Biological role of cell-free nucleic acids in cancer: the theory of genomastasis, *Crit. Rev. Oncol.*, **18**, 153-161, doi: 10.1615/critrevoncog.v18.i1.2-90.
- García-Olmo, D., García-Olmo, D. C., Domínguez-Berzosa, C., Guadalajara, H., Vega, L., and García-Arranz, M. (2012) Oncogenic transformation induced by cell-free nucleic acids circulating in plasma (genomastasis) remains after the surgical resection of the primary tumor: a pilot study, *Expert Opin. Biol. Ther.*, **12 Suppl 1**, S61-S68, doi: 10.1517/14712598.2012.685151.
- Olmedillas-López, S., García-Olmo, D. C., García-Arranz, M., Peiró-Pastor, R., Aguado, B., and García-Olmo, D. (2018) Liquid biopsy by NGS: differential presence of exons (DPE) in cell-free DNA reveals different patterns in metastatic and nonmetastatic colorectal cancer, *Cancer Med.*, **7**, 1706-1716, doi: 10.1002/cam4.1399.
- Mittra, I., Khare, N. K., Raghuram, G. V., Chaubal, R., Khambatti, F., Gupta, D., Gaikwad, A., Prasannan, P., Singh, A., Iyer, A., Singh, A., Upadhyay, P., Nair, N. K., Mishra, P. K., and Dutt, A. (2015) Circulating nucleic acids damage DNA of healthy cells by integrating into their genomes, *J. Biosci.*, **40**, 91-111, doi: 10.1007/s12038-015-9508-6.
- Souza, A. G., Bastos, V. A. F., Fujimura, P. T., Ferreira, I. C. C., Leal, L. F., da Silva, L. S., Laus, A. C., Reis, R. M., Martins, M. M., Santos, P. S., Corrêa, N. C. R., Marangoni, K., Thomé, C. H., Colli, L. M., Goulart, L. R., and Goulart, V. A. (2020) Cell-free DNA promotes malignant transformation in

- non-tumor cells, *Sci. Rep.*, **10**, 21674, doi: 10.1038/s41598-020-78766-5.
15. Alekseeva, L. A., Mironova, N. L., Brenner, E. V., Kurilshikov, A. M., Patutina, O. A., and Zenkova, M. A. (2017) Alteration of the exDNA profile in blood serum of LLC-bearing mice under the decrease of tumour invasion potential by bovine pancreatic DNase I treatment, *PLoS One*, **12**, e0171988, doi: 10.1371/journal.pone.0171988.
 16. Alekseeva, L. A., Sen'kova, A. V., Zenkova, M. A., and Mironova, N. L. (2020) Targeting circulating SINEs and LINEs with DNase I provides metastases inhibition in experimental tumor models, *Mol. Ther. Nucleic Acids*, **20**, 50-61, doi: 10.1016/j.omtn.2020.01.035.
 17. Alekseeva, L., Sen'kova, A., Savin, I., Zenkova, M., and Mironova, N. (2021) Human recombinant DNase I (Pulmozyme®) inhibits lung metastases in murine metastatic b16 melanoma model that correlates with restoration of the DNase activity and the decrease SINE/LINE and c-Myc fragments in blood cell-free DNA, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 12074, doi: 10.3390/ijms222112074.
 18. Park, J. G., Kramer, B. S., Steinberg, S. M., Carmichael, J., Collins, J. M., Minna, J. D., and Gazdar, A. F. (1987) Chemosensitivity testing of human colorectal carcinoma cell lines using a tetrazolium-based colorimetric assay, *Cancer Res.*, **47**, 5875-5879.
 19. Lee, T. H., Chennakrishnaiah, S., Audemard, E., Montermini, L., Meehan, B., and Rak, J. (2014) Oncogenic *ras*-driven cancer cell vesiculation leads to emission of double-stranded DNA capable of interacting with target cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **451**, 295-301, doi: 10.1016/j.bbrc.2014.07.109.
 20. Baca, S. C., Prandi, D., Lawrence, M. S., Mosquera, J. M., Romanel, A., Drier, Y., Park, K., Kitabiyashi, N., MacDonald, T. Y., Ghandi, M., Van Allen, E., Kryukov, G. V., Sboner, A., Theurillat, J. P., Soong, T. D., Nickerson, E., Auclair, D., Tewari, A., Beltran, H., Onofrio, R. C., Boysen, G., Guiducci, C., Barbieri, C. E., Cibulskis, K., Sivachenko, A., Carter, S. L., Saksena, G., Voet, D., Ramos, A. H., Winckler, W., Cipicchio, M., Ardlie, K., Kantoff, P. W., Berger, M. F., Gabriel, S. B., Golub, T. R., Meyerson, M., Lander, E. S., Elemento, O., Getz, G., Demichelis, F., Rubin, M. A., and Garraway, L. A. (2013) Punctuated evolution of prostate cancer genomes, *Cell*, **153**, 666-677, doi: 10.1016/j.cell.2013.03.021.
 21. Chen, R., Du, J., Zhu, H., and Ling, Q. (2021) The role of cGAS-STING signalling in liver diseases, *JHEP Rep.*, **3**, 100324, doi: 10.1016/j.jhepr.2021.100324.
 22. Brezgin, S., Kostyusheva, A., Ponomareva, N., Volia, V., Goptar, I., Nikiforova, A., Shilovskiy, I., Smirnov, V., Kostyushev, D., and Chulanov, V. (2020) Clearing of foreign episomal DNA from human cells by CRISPRa-mediated activation of cytidine deaminases, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 6865, doi: 10.3390/ijms21186865.
 23. Cotterman, R., Jin, V. X., Krig, S. R., Lemen, J. M., Wey, A., Farnham, P. J., and Knoepfler, P. S. (2008) N-Myc regulates a widespread euchromatic program in the human genome partially independent of its role as a classical transcription factor, *Cancer Res.*, **68**, 9654-9662, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-1961.
 24. Judson, H., van Roy, N., Strain, L., Vandesompele, J., Van Gele, M., Speleman, F., and Bonthron, D. T. (2000) Structure and mutation analysis of the gene encoding DNA fragmentation factor 40 (caspase-activated nuclease), a candidate neuroblastoma tumour suppressor gene, *Hum Genet.*, **106**, 406-413, doi: 10.1007/s004390000257.
 25. Larsen, B. D., and Sorensen, C. S. (2017) The caspase-activated DNase: apoptosis and beyond, *FEBS J.*, **284**, 1160-1170, doi: 10.1111/febs.13970.
 26. Alekseeva, L., and Mironova, N. (2021) Role of cell-free DNA and deoxyribonucleases in tumor progression, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 12246, doi: 10.3390/ijms222212246.
 27. Fahmi, T., Wang, X., Zhdanov, D. D., Islam, I., Apostolov, E. O., Savenka, A. V., and Basnakian, A. G. (2020) DNase I induces other endonucleases in kidney tubular epithelial cells by its DNA-degrading activity, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 8665, doi: 10.3390/ijms21228665.
 28. McCord, J. J., Engavale, M., Masoumzadeh, E., Villarreal, J., Mapp, B., Latham, M. P., Keyel, P. A., and Sutton, R. B. (2022) Structural features of Dnase1L3 responsible for serum antigen clearance, *Commun. Biol.*, **5**, 825, doi: 10.1038/s42003-022-03755-5.
 29. Wang, G., Lam, W. K. J., Ling, L., Ma, M. L., Ramakrishnan, S., Chan, D. C. T., Lee, W. S., Cheng, S. H., Chan, R. W. Y., Yu, S. C. Y., Tse, I. O. L., Wong, W. T., Jiang, P., Chiu, R. W. K., Allen Chan, K. C., and Lo, Y. M. D. (2022) Fragment ends of circulating microbial DNA as signatures for pathogen detection in sepsis, *Clin. Chem.*, **69**, 189-201, doi: 10.1093/clinchem/hvac197.
 30. Udou, T., Hachisuga, T., Tsujioka, H., and Kawarabayashi, T. (2004) The role of c-jun protein in proliferation and apoptosis of the endometrium throughout the menstrual cycle, *Gynecol. Obstet. Invest.*, **57**, 121-126, doi: 10.1159/000075701.
 31. Leech, J. T., Brennan, A., Don, N. A., Mason, J. M., and Kad, N. M. (2022) *In vitro* single molecule and bulk phase studies reveal the AP-1 transcription factor cFos binds to DNA without its partner cJun, *J. Biol. Chem.*, **298**, 102229, doi: 10.1016/j.jbc.2022.102229.
 32. Li, C., Kuai, L., Cui, R., and Miao, X. (2022) Melanogenesis and the targeted therapy of melanoma, *Bio-molecules*, **12**, 1874, doi: 10.3390/biom12121874.

33. Roers, A., Hiller, B., and Hornung, V. (2016) Recognition of endogenous nucleic acids by the innate immune system, *Immunity*, **44**, 739-754, doi: 10.1016/j.immuni.2016.04.002.
34. Kostjuk, S., Loseva, P., Chvartatskaya, O., Ershova, E., Smirnova, T., Malinovskaya, E., Roginko, O., Kuzmin, V., Izhevskaya, V., Baranova, A., Ginter, E., and Veiko, N. (2012) Extracellular GC-rich DNA activates TLR9- and NF- κ B-dependent signaling pathways in human adipose-derived mesenchymal stem cells (haMSCs), *Expert. Opin. Biol. Ther.*, **12 Suppl 1**, S99-S111, doi: 10.1517/14712598.2012.690028.
35. Kawai, K., Li, Y. S., Song, M. F., and Kasai, H. (2010) DNA methylation by dimethyl sulfoxide and methionine sulfoxide triggered by hydroxyl radical and implications for epigenetic modifications, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **20**, 260-265, doi: 10.1016/j.bmcl.2009.10.124.
36. Duvvuri, B., and Lood, C. (2019) Cell-free DNA as a biomarker in autoimmune rheumatic diseases, *Front. Immunol.*, **10**, 502, doi: 10.3389/fimmu.2019.00502.

IMPACT OF CELL-FREE DNA FROM BLOOD SERUM OF MICE WITH METASTATIC MELANOMA ON THE ENHANCEMENT OF ONCOGENIC PROPERTIES OF MELANOMA CELLS

A. A. Filatova^{1,2}, L. A. Alekseeva¹, I. A. Savin¹, A. V. Sen'kova¹,
M. A. Zenkova¹, and N. L. Mironova^{1*}

¹ *Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, 630090 Novosibirsk, Russia; e-mail: mironova@niboch.nsc.ru*

² *Faculty of Natural Sciences, Novosibirsk State University, 630090 Novosibirsk, Russia*

Currently, a significant increase in the levels of circulating cell-free DNA (cfDNA) in the blood of patients is a generally recognized marker of the development of oncological diseases. Although tumor-associated cfDNA has been well studied, its biological functions remain unclear. In this work, we investigated the effect of cfDNA isolated from the blood serum of mice with B16-F10 metastatic melanoma on the properties of B16-F10 melanoma cells *in vitro*. It was found that the profile of cfDNA isolated from blood serum of mice with melanoma differs significantly from the cfDNA isolated from blood serum of healthy mice, and is similar concerning the abundance of oncogenes and mobile genetic elements (MGE) to the genomic DNA of B16 cells. It was shown that cfDNA of mice with melanoma penetrated into B16 cells, resulting to the increase in the abundance of oncogenes and MGE fragments, and caused the 5-fold increased mRNA level of the secreted DNase *Dnase II3* and a slight increase of the mRNA level of the *Jun*, *Fos*, *Ras*, and *Myc* oncogenes. cfDNA of healthy mice caused increasing of mRNA level of the intracellular regulatory DNase *EndoG* and a 4-fold increase of mRNA level of *Fos* and *Ras* oncogenes, which are well-known triggers of a large number of signal cascades, from apoptosis inhibition to increased tumor cell proliferation. Thus, it is obvious that the circulating cfDNA of tumor origin is able to penetrate into cells and, despite the fact that no changes were found in the level of viability and migration activity of tumor cells, cfDNA, even with a single exposure, can cause changes at the cellular level that increase the oncogenicity of recipient cells.

Keywords: circulating cell-free DNA, melanoma B16

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ПОТЕНЦИАЛА СОЛОКСОЛОН ТРИПТАМИДА В ОТНОШЕНИИ МУЛЬТИФОРМНОЙ ГЛИОБЛАСТОМЫ С ПОМОЩЬЮ *in silico, in vitro* И *in vivo* ПОДХОДОВ

© 2023 А.В. Марков*, К.В. Одаренко, А.В. Сенькова, А.А. Ильина, М.А. Зенкова

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
630090 Новосибирск, Россия; электронная почта: andmrkv@gmail.com

Поступила в редакцию 02.02.2023

После доработки 13.03.2023

Принята к публикации 03.04.2023

Мультиформная глиобластома (МГБ) представляет собой крайне агрессивное онкологическое заболевание, характеризующееся неконтролируемым диффузным ростом, развитием резистентности к радио- и химиотерапии и высокой вероятностью рецидивов, что определяет низкую выживаемость пациентов с МГБ. Учитывая большое количество сигнальных путей, задействованных в регуляции патогенеза МГБ, разработка новых антиглиобластомных препаратов на основе мультитаргетных природных метаболитов является перспективным направлением исследований. В настоящей работе изучен противоопухолевый потенциал полусинтетического тритерпеноида солоксолон триптамида (СТА) в отношении клеток глиобластомы человека U87. Было установлено, что СТА эффективно блокирует пролиферацию клеток U87 как в 2D-, так и в 3D-культуре *in vitro*, усиливает адгезивные свойства опухолевых клеток и проявляет цитотоксическое действие синергично с темозоломидом. С помощью подходов компьютерной биологии установлено, что выраженная антиглиобластомная активность СТА может быть обусловлена его прямым взаимодействием с EGFR, ERBB2 и AKT1, играющими важную роль в регуляции злокачественности МГБ. Помимо прямого действия на клетки U87, СТА оказывал нормализующее действие на опухолевое микроокружение на мышинной гетеротопической ксенографтной модели глиобластомы U87, подавляя развитие сети незрелых тонкостенных кровеносных сосудов и продукцию эластана в опухолевой ткани. Полученные данные позволяют предложить СТА в качестве перспективного антиглиобластомного кандидата.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: мультиформная глиобластома, цианоеноновый фармакофор, пентациклические тритерпеноиды, сфероиды, ангиогенез, синергичность, молекулярный докинг, геномные сети, опухолевое микроокружение.

DOI: 10.31857/S0320972523070126, EDN: FYGZSR

ВВЕДЕНИЕ

Согласно данным Всемирной организации здравоохранения, мультиформная глиобластома (МГБ) представляет собой одно из наиболее агрессивных неопластических заболеваний головного мозга, распространенность которого составляет примерно 1 случай на 100 000 населения в год [1]. Несмотря на получение медицинской помощи в полном объеме, включающем максимальную резекцию опухоли, лучевое воздействие на ее ложе и химиотерапию темозоломидом (ТМЗ), медианное значение

продолжительности жизни пациентов с МГБ составляет лишь 15–18 месяцев [2]. Данный факт объясняется высокой злокачественностью клеток глиобластомы, их способностью к диффузному инфильтративному росту в окружающие ткани и развитием устойчивости клеток опухоли к радио- и химиотерапии, что определяет склонность МГБ к рецидивам [1]. Низкая эффективность лечения данного онкологического заболевания также связана с крайне ограниченным арсеналом лекарственных препаратов, одобренных для терапии МГБ, включающим ТМЗ (алкилирующий агент на основе

Принятые сокращения: МГБ – мультиформная глиобластома; СТА – солоксолон триптамид; ТМЗ – темозоломид; ALDH – альдегиддегидрогеназа; TGF-β – трансформирующий ростовой фактор бета.

* Адресат для корреспонденции.

имидазолтетразина, препарат первой линии) и бевацизумаб (гуманизированное рекомбинантное антитело к эндотелиальному фактору роста сосудов (VEGF), препарат второй линии), использование которых ограничивается развитием у клеток МГБ лекарственной устойчивости и низкой эффективностью их проникновения в опухолевую ткань соответственно [3]. Таким образом, поиск новых лекарственных агентов, способных эффективно проникать через гематоэнцефалический барьер и блокировать пролиферацию и инвазионные свойства клеток МГБ является критически важным направлением современной медицинской химии.

Отличительной особенностью МГБ является ее выраженная гетерогенность, т.е. существование в рамках одной опухоли различных популяций опухолевых клеток, отличающихся друг от друга профилем ключевых сигнальных путей и, как результат, характеризующихся разным функциональным состоянием [2]. Данная особенность лежит в основе низкой эффективности современной химиотерапии МГБ [4] и свидетельствует о перспективности использования мультитаргетной стратегии для создания новых антиглиобластомных препаратов [5]. Одним из важных источников мультитаргетных фармакологически активных соединений являются природные метаболиты, активно исследуемые в настоящее время в качестве агентов, блокирующих пролиферацию и инвазивность клеток МГБ не только в клеточных экспериментах, но и на ортотопических моделях глиобластомы *in vivo* [6].

Ранее нами в сотрудничестве с исследователями из лаборатории фармакологически активных веществ Новосибирского института органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН было разработано полусинтетическое производное глицирретовой кислоты солоксолон триптамид (СТА), обладающий комплексным противоопухолевым эффектом в отношении клеток МГБ *in vitro*, включающим индукцию митохондриального стресса с последующим запуском апоптоза, блокировку клонотического потенциала, клеточной подвижности и способности клеток МГБ к васкулогенной мимикрии [7]. Кроме этого, на гетеротопической ксенографтной мышинной модели было установлено, что СТА способен эффективно проникать через гематоэнцефалический барьер и достоверно подавлять рост глиобластомы человека U87 *in vivo* [7]. Целью настоящего исследования является расширение знаний об антиглиобластомном потенциале СТА. В данной работе изучен эффект СТА на рост клеток МГБ человека U87 в 3D-культуре и

их адгезионные свойства, проанализирована синергичность цитотоксического действия СТА с TMZ в отношении клеток глиобластомы U87 и влияние СТА на ряд характеристик опухолевого микроокружения в эксперименте с глиобластомой U87 *in vivo*. Кроме этого, с помощью подходов компьютерной биологии установлен ряд потенциальных белковых мишеней СТА, определяющих его выраженные антиглиобластомные свойства. Полученные данные позволяют предложить СТА в качестве перспективного лекарственного кандидата, оказывающего комплексный модулирующий эффект на ключевые характеристики, определяющие высокую злокачественность МГБ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследуемое соединение. Солоксолон триптамид (СТА) был синтезирован в лаборатории фармакологически активных веществ Новосибирского института органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН с.н.с., к.х.н. Саломатиной О.В., согласно опубликованной ранее методике [7], и передан для проведения биологических испытаний в виде кристаллического порошка. СТА был растворен в диметилсульфоксиде (ДМСО) в концентрации 10 мМ и хранился при -20°C до проведения экспериментов.

Культивирование клеток МГБ человека U87. Клетки глиобластомы человека U87, полученные из Американской коллекции клеточных культур («ATCC», США), культивировали в питательной среде Игла в модификации Дульбекко (DMEM; «Sigma Aldrich», США), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (FBS; «Gibco», США) и раствор антибиотикомикотиков («MP Biomedicals», Франция), включающий пенициллин, стрептомицин и амфотерицин в конечных концентрациях 100 ед./мл, 0,1 мг/мл и 0,25 мкг/мл соответственно. Культуру клеток поддерживали в инкубаторе с увлажненной атмосферой при температуре 37°C с 5%-ным содержанием CO_2 (далее — стандартные условия).

Оценка цитотоксичности СТА на 2D-культуре клеток U87 (МТТ-тест). Клетки U87 высаживали в 96-луночные планшеты («TPP», Швейцария) в концентрации 10^4 клеток на лунку в среде DMEM, содержащей 10% FBS (DMEM/10% FBS), и инкубировали в стандартных условиях в течение 24 ч. Затем питательную среду заменяли на бессывороточную с добавлением СТА (100–800 нМ), и инкубировали клетки дополнительные 24 ч,

после чего добавляли в каждую лунку раствор соли тетразола (МТТ) до конечной концентрации 0,5 мг/мл. Спустя 2 ч инкубации среду удаляли, добавляли 100 мкл ДМСО для растворения кристаллов формазана и измеряли поглощение растворов при длине волны 570 нм и референсной длине волны 620 нм на многоканальном спектрофотометре Multiscan RC plate reader («Thermo LabSystems», Финляндия).

Исследование эффекта СТА на рост сфероидов клеток U87. Оценку воздействия СТА на рост сфероидов U87 проводили с помощью двух экспериментальных методик: путем культивирования клеток на планшетах, дно которых было покрыто 1%-ной агарозой (1) либо гидрофильным, неиногенным, нейтрально заряженным гидрогелем («Corning», США); далее — планшеты со сверхнизким сцеплением дна (2). На первом этапе клетки U87 в среде DMEM/10% FBS помещали в покрытые агарозой 48-луночные планшеты («TPP») и 6-луночные планшеты («Servicebio», Китай) со сверхнизким сцеплением дна в концентрации 2×10^3 и 5×10^5 клеток на лунку соответственно. После инкубации в течение 7 и 4 дней в стандартных условиях для методик (1) и (2) соответственно к получившимся сфероидом добавляли СТА в среде DMEM без добавления сыворотки до конечных концентраций 0,1–2 мкМ. Фотографии сфероидов делали с помощью инвертированного микроскопа ZEISS Primo Vert со встроенной камерой ZEISS AxioCam ERc5s («Carl Zeiss Microscopy GmbH», Германия) сразу после добавления растворов СТА и затем каждые 2–3 суток до 28 суток инкубации (1) либо однократно через 2 суток после добавления тритерпеноида (2). Для каждой экспериментальной группы определяли площадь 4 (1) или 250 (2) сфероидов с помощью программы ImageJ («NIH», США) и нормировали данный показатель на среднюю площадь сфероидов в контроле (клетки U87 без добавления СТА).

Исследование эффекта СТА на TGF- β -стимулированное формирование сфероидо-подобных структур на монослое клеток U87. Клетки U87 в среде DMEM/10% FBS высаживали в 96-луночные планшеты в концентрации 5×10^3 клеток на лунку и культивировали в течение ночи в стандартных условиях. Затем заменяли питательную среду на среду без сыворотки, содержащую TGF- β 1 (50 нг/мл) («Prospec», Израиль) и СТА (200, 400 мкМ). Через 48 ч после индукции формирование сфероидо-подобных структур регистрировали с помощью инвертированного микроскопа EVOS XL Core («Thermo Fisher Scientific», США). Для каждой экспериментальной и контрольной

групп фотографировали 4 поля при $200\times$ увеличении микроскопа с использованием встроенной CMOS-камеры. Для каждой экспериментальной группы определяли площадь не менее 10 сфероидо-подобных структур с помощью программы ImageJ и нормировали данный показатель на среднюю площадь сфероидов в контрольной группе (инкубация с TGF- β , но без СТА).

Исследование эффекта СТА на адгезивные свойства клеток U87 (трипсиновый тест). Клетки U87 высаживали в 96-луночные планшеты в концентрации 10^4 клеток на лунку в среде DMEM/10% FBS и культивировали в течение ночи в стандартных условиях. Затем заменяли питательную среду на среду без сыворотки, содержащую СТА в концентрации 25–100 нМ, и инкубировали 24 ч в стандартных условиях. По окончании инкубации к клеткам добавляли 30 мкл TrypLE™ («Gibco»), разбавленного фосфатно-солевым буфером (PBS) (1 : 10), помещали планшет в CO₂-инкубатор на 3 мин, после чего дважды промывали клетки средой DMEM/10% FBS. Количество клеток, оставшихся прикрепленными ко дну лунки после отмывки, оценивали с помощью МТТ-теста.

Исследование эффекта СТА на адгезивность клеток U87 к коллагеновой подложке. Клетки U87 высаживали в 6-луночные планшеты в концентрации $2,8 \times 10^5$ клеток на лунку в среде DMEM/10% FBS и инкубировали в течение ночи в стандартных условиях. Затем среду убрали, к клеткам добавляли СТА (25–100 нМ) в среде DMEM без добавления сыворотки и дополнительно культивировали 24 ч в стандартных условиях. По окончании инкубации клетки открепляли от поверхности планшеты с помощью TrypLE™, ресуспендировали в среде DMEM/10% FBS и высаживали в концентрации 10^5 клеток на лунку в 96-луночные планшеты, дно которых было предварительно покрыто коллагеном, выделенным из хвоста крысы («Cell Applications, Inc.», США). Через 1 ч инкубации в стандартных условиях лунки планшеты дважды промывали PBS и оценивали с помощью МТТ-теста количество клеток, прикрепившихся к коллагеновой подложке.

Исследование сочетанного действия СТА и ТМЗ на клетках U87. Клетки U87 высаживали в 96-луночные планшеты в концентрации 10^4 клеток на лунку в среде DMEM/10% FBS и инкубировали ночь в стандартных условиях. Затем среду в лунках заменяли на DMEM без сыворотки, добавляли СТА и/или темозоломид до конечных концентраций 0,1–1 и/или 100–500 мкМ соответственно и культивировали клетки в течение 72 ч в стандартных условиях.

По окончании инкубации количество живых клеток U87 оценивали с помощью МТТ-теста. Анализ типа сочетанного действия соединений проводили с помощью веб-ресурса SynergyFinder (<https://synergyfinder.fimm.fi>) [8].

Анализ активности альдегиддегидрогеназы в клетках U87. Клетки U87 в среде DMEM/10% FBS высаживали в 6-луночные планшеты в концентрации $2,8 \times 10^5$ клеток на лунку и инкубировали в течение ночи в стандартных условиях. Затем среду убирали, и к клеткам добавляли СТА в концентрациях 0,5 и 1 мкМ в среде DMEM без сыворотки и вновь инкубировали 24 ч в стандартных условиях. После этого активность альдегиддегидрогеназы (ALDH) определяли с помощью коммерческого набора AldeRed® ALDH Detection Assay («Sigma-Aldrich Inc.», Германия), согласно протоколу производителя. Коротко, клетки снимали с поверхности планшета с помощью TrypLE™, ресуспендировали в 1 мл буфера AldeRed Assay Buffer и добавляли в каждую пробирку 5 мкл флуоресцентного красителя AldeRed, а в контрольные пробирки дополнительно добавляли 5 мкл ингибитора ALDH диэтиламинобензальдегида (DEAB). После инкубации в течение 45 мин в стандартных условиях клетки собирали с помощью центрифугирования, ресуспендировали их в 200 мкл буфера, помещали пробирки в лед и проводили анализ образцов на проточном цитофлуориметре NovoCyte («ACEA Biosciences, Inc», США) с помощью программного обеспечения NovoExpress Software («ACEA Biosciences, Inc»). Для каждого образца проводили анализ 10 000 событий.

Идентификация потенциальных белковых мишеней СТА с помощью *in silico* подходов. На первом этапе анализа определяли возможные первичные белковые мишени СТА путем анализа его структуры хемоинформатическими платформами Polypharmacology Browser 2.0 [9] и Swiss-TargetPrediction [10], после чего добавляли их по отдельности к списку генов, ассоциированных, согласно базе данных DisGeNET, с патогенезом МГБ C1621958 (3197 генов), и строили для дополненных списков генные ассоциативные сети с использованием базы данных STRING (the Search Tool for Retrieval of Interacting Genes/Proteins) [11]. Полученные сети визуализировали в программной среде Cytoscape 3.9.1 и анализировали с помощью плагина cytoHubba [12]: для каждой первичной мишени СТА вычисляли «Degree», «MCC» и «Betweenness» (характеристики центральности гена в сети), ранжировали списки мишеней по данным показателям и вычисляли «общий ранг» как среднее от ранга мишени по трем показателям.

На следующем этапе с помощью молекулярного докинга проводили моделирование взаимодействия СТА с наиболее связанными с генной сетью глиобластомы (т.е. характеризующимися наименьшим значением ранга) мишенями. Кристаллические структуры EGFR (Protein Data Bank (PDB) ID: 8A2D), AKT1 (PDB ID: 3O96), FYN (PDB ID: 2DQ7) и ERBB2 (PDB ID: 3RCD) были взяты из базы данных RCSB PDB (<https://www.rcsb.org/>), из них удаляли молекулы воды и кокристаллизованные лиганды (известные ингибиторы) с помощью Discovery Studio Visualizer v21.1.0 и добавляли полярные водороды и частичные атомные заряды по методу Гастейгера с помощью AutoDock Tools 1.5.7. 2D-Структуры СТА и известных ингибиторов переводили в трехмерную форму в MarvinSketch v22.1, оптимизировали геометрию молекул с помощью Avogadro v1.2.0 (силовое поле MMFF94) и устанавливали способность связей внутри лигандов к свободному вращению с помощью AutoDock Tools 1.5.7. Моделирование взаимодействий «лиганд–белок» проводили в программе AutoDockVina [13] с использованием следующих параметров: EGFR – size_x = 22, size_y = 14, size_z = 16, center_x = -1,379, center_y = -9,243, center_z = 18,98; AKT1 – size_x = 14, size_y = 18, size_z = 18, center_x = 8,507, center_y = -7,504, center_z = 10,15; FYN – size_x = 14, size_y = 14, size_z = 14, center_x = -15,594, center_y = 17,532, center_z = -12,787; ERBB2 – size_x = 16, size_y = 16, size_z = 14, center_x = 13,147, center_y = 29,114, center_z = 29,114. Докинг-комплексы с прочными взаимодействиями между лигандом и белком ($\Delta G \leq 7,0$ ккал/моль) визуализировали с помощью Discovery Studio Visualizer v21.1.0 и LigPlot⁺ v.2.2.7 в 3D- и 2D-форматах соответственно и отбирали структуры, стабилизированные наибольшим количеством водородных связей.

Потенциальные белковые мишени СТА, отобранные с помощью молекулярного докинга, наносили на иерархическое дерево киназа человека с помощью платформы KinMap (<http://www.kinhub.org/kinmap/>), в структуре которого отмечали киназы, ассоциированные с патогенезом МГБ (согласно базе данных Open Targets Platform (<https://platform.opentargets.org/>)).

Лабораторные животные. В работе использовали 6–8-недельных бестимусных мышей-самок линии Nude развода Российского национального центра генетических ресурсов лабораторных животных на базе SPF-вивария Института цитологии и генетики (ИЦиГ)

СО РАН (Новосибирск, Россия). Животных содержали в SPF-виварии ИЦиГ СО РАН по 6 особей в клетке в соответствии с нормами содержания SPF-животных. Мыши имели свободный доступ к еде и воде. Клетки, подстилка, корм и вода подвергались автоклавированию.

Гетеротопическая ксенографтная модель МГБ. Для формирования ксенографтной модели с первичным опухолевым узлом суспензию клеток глиобластомы U87 (2×10^7 клеток/мл) вводили подкожно в левый бок мышам линии Nude в 0,1 мл 0,9%-ного раствора натрия хлорида с 0,05 мл матригеля (Matrigel® Matrix; «Corning», США). На 5-й день после трансплантации животных распределяли на группы — по 6 мышей в каждой: (1) мыши, получавшие внутрибрюшинные (в.б.) инъекции 10%-ного Tween-80 (контроль) и (2) мыши, получавшие в.б. инъекции соединения СТА в 10%-ном Tween-80 в дозе 20 мг/кг. Все в.б. инъекции проводили в объеме 200 мкл 3 раза в неделю. Всего было произведено 7 инъекций. Мышей выводили из эксперимента на 21-й день роста опухоли путем дислокации шейных позвонков под изофлюрановой анестезией. Производили забор опухолевых узлов для последующего гистологического исследования.

Гистология. Опухолевые узлы фиксировали в 10%-ном нейтральном формалине («Bio-Vitrum», Россия), затем производили обезвоживание в спиртах возрастающей концентрации, просветляли ксилолом и заключали в парафин HISTOMIX («BioVitrum»). Парафиновые срезы толщиной до 5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином. Локализацию и количество стромального компонента опухоли (эластиновые волокна) определяли с помощью окрашивания срезов по Ван Гизону [14]. Гистологические срезы анализировали на микроскопе Axiostar plus, оснащенный камерой Axiocam MRc5 («Zeiss», Германия).

Морфометрическое исследование опухолевых узлов. Морфометрический анализ гистологических срезов опухолевых узлов проводили с использованием закрытой тестовой системы из 100 точек площадью $3,2 \times 10^6$ мкм² при 200× увеличении микроскопа, накладывая сетку случайным образом. При проведении морфометрического исследования опухолевых узлов подсчитывали объемные плотности стромального компонента опухолевой ткани и численную плотность тонкостенных кровеносных сосудов в ткани опухоли. Объемную плотность оцениваемой гистологической структуры подсчитывали по формуле:

$$V_v = (P_{\text{структура}} / P_{\text{тест}}) \times 100\%,$$

где $P_{\text{структура}}$ — количество точек, которые приходятся на структуру, а $P_{\text{тест}}$ — общее количество тестовых точек, в данном случае — 100. Численную плотность оцениваемой гистологической структуры определяли путем подсчета количества структур в пределах тестового поля, в данном случае — $3,2 \times 10^6$ мкм². Всего оценивали по 5 полей зрения в каждом образце для каждой гистологической структуры; таким образом, всего было проанализировано по 30 полей зрения в каждой экспериментальной группе.

Статистический анализ полученных данных проводили с помощью программного пакета GraphPad Prism 8.0.1. Проверку нормальности распределения количественных показателей проводили с использованием критерия Шапиро–Уилка. Для оценки достоверности различий между группами с нормальным и ненормальным распределениями применяли непарный критерий Стьюдента и непараметрический U-критерий Манна–Уитни соответственно. Различия считались достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

СТА эффективно подавляет рост сфероидов клеток U87. На первом этапе исследования была оценена цитотоксичность СТА (рис. 1, а) в отношении клеток МГБ человека U87 *in vitro*. Исследуемый тритерпеноид эффективно подавлял жизнеспособность клеток U87 в монослое в низких субмикромольных концентрациях: его значение $IC_{50}^{(24 \text{ ч})}$ составило около 0,7 мкМ (рис. 1, б). Учитывая, что монослой клеток (2D-культура) не в полной мере моделирует опухолевый рост *in vivo*, при котором опухолевые клетки в зависимости от положения в опухолевом узле имеют различный доступ к питательным веществам и кислороду, противоопухолевый потенциал СТА был далее проанализирован на сфероиде МГБ (3D-культура). Для этого к сфероидам клеток U87, сформированным в культуральных планшетах, покрытых 1%-ной агарозой, добавляли СТА (0,5–4 мкМ) и оценивали их относительную площадь каждые 2–4 дня в течение 21 суток. Как видно из рис. 1, в, в ходе эксперимента площадь сфероидов в контроле (без СТА) линейно росла, тогда как СТА дозозависимо тормозил рост сфероидов, причем эти различия в площади сфероидов становятся заметными, начиная с 7 дня инкубации. К концу эксперимента наблюдалось значительное снижение площади сфероидов в 2,5, 3 и 12,1 раза

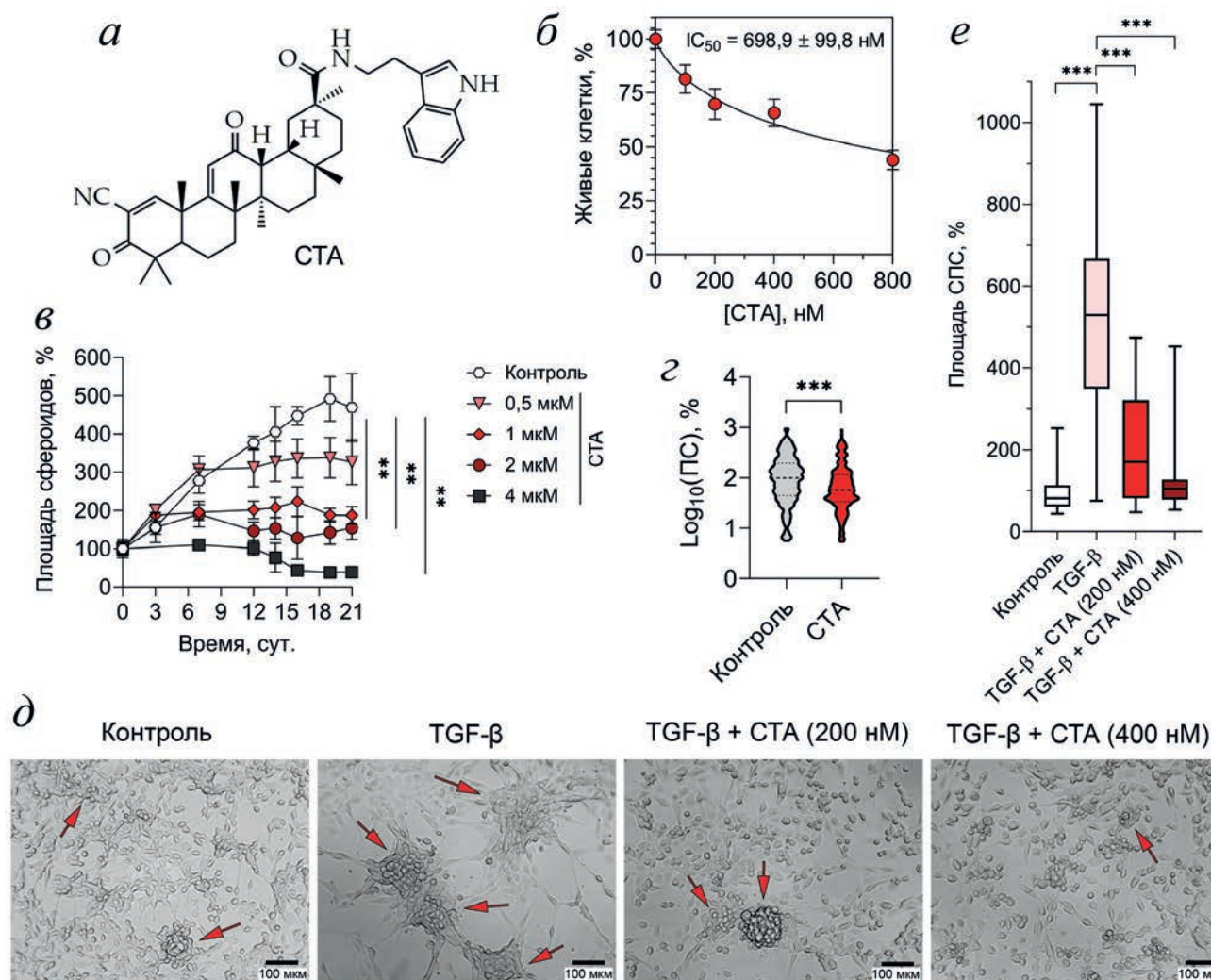


Рис. 1. Влияние СТА на рост клеток глиобластомы человека. *а* – Структурная формула СТА. *б* – Цитотоксичность СТА в отношении клеток U87. Клетки инкубировали с указанными концентрациями СТА в течение 24 ч, и затем оценивали уровень живых клеток с помощью МТТ-теста. *в* – Влияние СТА на рост сфероидов U87 в планшетах, дно которых покрыто агарозой, и планшетах со свёрхнизким сцеплением дна (*г*). К сфероидам U87 добавляли СТА в указанных концентрациях и оценивали площадь сфероидов в указанных временных точках (*в*) или через 48 ч инкубации (*г*) с помощью фазово-контрастной микроскопии. *д* и *е* – Влияние СТА на формирование сфероидо-подобных структур в монослое клеток U87 под действием TGF-β. Клетки инкубировали с TGF-β1 (50 нг/мл) и СТА (200, 400 мкМ) в течение 48 ч, и оценивали площадь сфероидов с помощью фазово-контрастной микроскопии. Фотографии сделаны при 200× увеличении (*д*), стрелками показаны сфероидо-подобные структуры. Площади сфероидов (*в*, *г*) и сфероидо-подобных структур (*е*) были подсчитаны с помощью программы ImageJ

по сравнению с контролем для концентраций СТА 1, 2 и 4 мкМ соответственно (рис. 1, *в*). Наблюдаемый супрессивный эффект СТА в отношении роста клеток МГБ в 3D-культуре был также подтвержден в независимом эксперименте со сфероидом клеток U87, сформированными на культуральных планшетах со свёрхнизким сцеплением дна. Из графика, представленного на рис. 1, *г*, видно, что инкубация сфероидов в присутствии 2 мкМ СТА в течение 48 ч приводила к достоверному снижению их площади.

Известно, что трансформирующий ростовой фактор бета (TGF-β) играет важную роль в регуляции злокачественности МГБ, усили-

вая их стволовые свойства, инвазивность и метастазирование [15]. Учитывая, что TGF-β является также известным стимулятором сфероидного роста клеток глиобластом [16], на следующем этапе работы был исследован эффект СТА на формирование сфероидо-подобных структур в монослое TGF-β-стимулированных клеток U87. Мы показали, что 3-дневный интактный монослой клеток U87 характеризовался небольшим количеством многослойных структур, размер которых в 5,3 раза увеличивался при стимуляции клеток TGF-β по сравнению с контролем, причем данный эффект не был связан с усилением пролиферации клеток (рис. 1, *д* и *е*). Инкубация TGF-β-

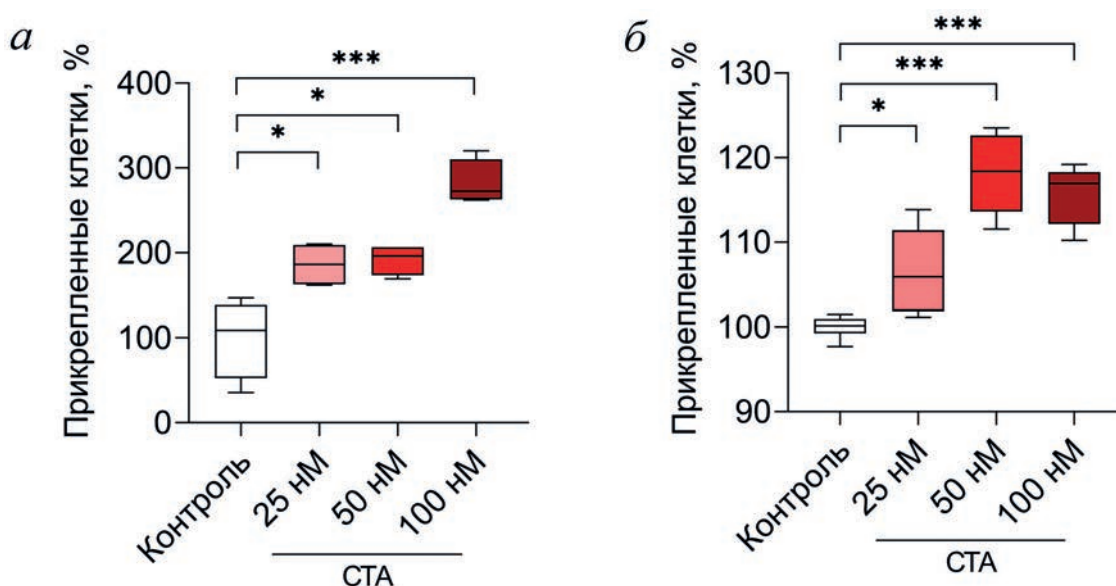


Рис. 2. Влияние СТА на адгезивные свойства клеток глиобластомы человека. *а* — Воздействие СТА на адгезивность клеток U87, оцененную методом трипсинизации. Клетки инкубировали с СТА в указанных концентрациях в течение 24 ч, затем обрабатывали TrypLE™, отмывали средой DMEM и определяли число клеток, оставшихся прикрепленными ко дну планшета с помощью МТТ-теста. *б* — Эффект СТА на адгезию клеток U87 к коллагеновой подложке. Клетки индуцировали СТА в указанных концентрациях в течение 24 ч, затем высаживали на 1 ч в лунки 96-луночного планшета, дно которого было покрыто коллагеном из хвоста крыс, после чего отмывали PBS и оценивали количество клеток, прикрепившихся к коллагеновой подложке, с помощью МТТ-теста. Данные представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение четырех (*а*) и шести (*б*) независимых экспериментов

стимулированных клеток в присутствии СТА в концентрации 200 нМ достоверно в 2,6 раза снижала размер сфероидо-подобных формирований по сравнению с TGF- β -обработанным контролем, а при дальнейшем повышении концентрации СТА до 400 нМ площадь сфероидо-подобных структур в TGF- β -стимулированных клетках U87 снижалась до значений интактного контроля (рис. 1, *д* и *е*).

СТА усиливает адгезивные свойства клеток U87. Установив наличие у СТА выраженных антипролиферативных свойств в отношении клеток U87 (рис. 1), далее мы проанализировали, обладает ли исследуемый тритерпеноид противоопухолевым потенциалом в нетоксичных концентрациях, сконцентрировав внимание на таком свойстве клеток U87, как адгезивность, ослабление которой ассоциировано с высоким метастатическим потенциалом МГБ [17].

Для оценки влияния СТА на адгезионную активность клеток монослой клеток U87 инкубировали в отсутствие (контроль) или в присутствии СТА в концентрациях 25–100 нМ в течение 24 ч, после чего обрабатывали клетки разбавленным раствором рекомбинантного трипсина TrypLE™ в течение 3 мин, отмывали открепившиеся клетки и оценивали количество клеток, прикрепленных ко дну планшета, с помощью МТТ-теста. Как видно из рис. 2, *а*, СТА во всех используемых концентрациях до-

стоверно усиливает адгезивность клеток U87, причем с увеличением концентрации СТА в среде увеличивается и количество неоткрепившихся клеток. Количество клеток, оставшихся прикрепленными ко дну планшета после действия TrypLE™, в экспериментальных группах превышало данный показатель в контроле в 1,9–2,8 раза.

Дополнительно был изучен эффект СТА в отношении адгезии клеток U87 к коллагеновой подложке, имитирующей *in vitro* внеклеточный матрикс. Клетки U87 инкубировали в присутствии 25–100 нМ СТА в течение 24 ч, после чего их снимали с планшета с помощью TrypLE™ и переносили на 96-луночный планшет, дно лунок которого было покрыто коллагеном из хвоста крыс. Клетки инкубировали на коллагеновых подложках в течение 1 ч, отмывали от неприкрепившихся клеток и оценивали количество прикрепившихся клеток с помощью МТТ-теста. Как и в случае с предыдущим экспериментом, СТА достоверно усиливал адгезионную активность клеток U87, при этом наибольшее усиление адгезии наблюдалось при концентрации СТА в среде 50 и 100 нМ (рис. 2, *б*).

СТА действует синергически в комбинации с ТМЗ в отношении жизнеспособности клеток U87. Как было отмечено выше, препаратом первой линии при терапии МГБ является ТМЗ, который представляет собой

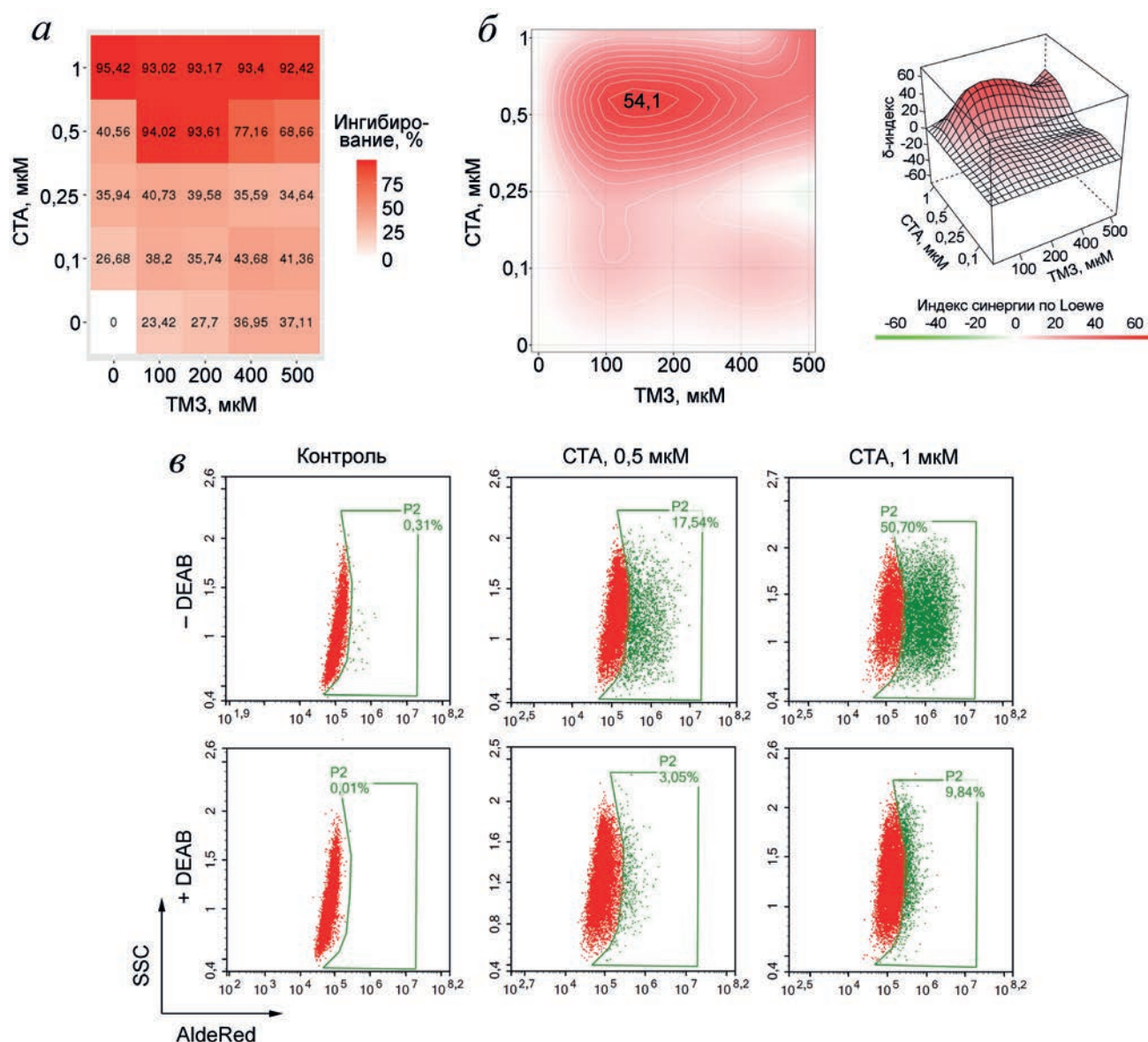


Рис. 3. Синергическое действие СТА и TMZ на клетки глиобластомы U87. *а* – Сочетанное действие СТА и TMZ в отношении жизнеспособности клеток U87. Клетки U87 культивировали с СТА и/или TMZ в указанных концентрациях в течение 72 ч, после чего количество живых клеток определяли с помощью МТТ-теста. *б* – Профиль совместного цитотоксического действия СТА и TMZ, построенный с помощью веб-ресурса SynergyFinder. *в* – Влияние СТА на активность ALDH в клетках U87. Клетки U87 инкубировали с СТА в указанных концентрациях в течение 24 ч и оценивали активность ALDH с помощью набора AldeRed® ALDH Detection Assay и проточной цитометрии. DEAB – диэтиламинобензальдегид

ДНК-метирующий агент, способствующий образованию в цепях ДНК O⁶-метилгуанина, последующему появлению в них двуцепочечных разрывов в результате репарации неканонических пар нуклеотидов и, как результат, гибели клеток МГБ [18]. Учитывая критическую важность данного алкилирующего агента в схемах лечения МГБ, важным аспектом разработки новых антиглиобластомных лекарственных кандидатов является оценка их сочетанного действия с TMZ. Для этого клетки U87 инкубировали в присутствии различных концентраций СТА (0,1–1 мкМ) и TMZ (100–

500 мкМ) в течение 72 ч, после чего определяли количество жизнеспособных клеток с помощью МТТ-теста и анализировали характер сочетанного действия исследуемых препаратов с помощью платформы SynergyFinder 2.0 [8]. Как видно из тепловой карты, представленной на рис. 3, *а*, TMZ обладал слабым уровнем цитотоксичности в отношении клеток U87 ($IC_{50}^{(72 ч)} > 500$ мкМ), в то время как СТА в концентрации 1 мкМ приводил практически к полной гибели опухолевых клеток $IC_{50}^{(72 ч)} = 0,4 \pm 0,1$ мкМ). При совместном применении TMZ и СТА действовали синергически

при использовании СТА в пределах значения его IC_{50} : наибольший δ -индекс синергии составлял 54,1 при сочетании 0,5 мкМ СТА и 100 мкМ ТМЗ, вызывая гибель 94% клеток глиобластомы U87 через 72 ч (рис. 3, б). Интересно, что дальнейшее повышение концентраций исследуемых соединений приводило к снижению δ -индекса (рис. 3, б), что может свидетельствовать о запуске в клетках U87 компенсационных механизмов в ответ на нарастающий ксенобиотический стресс. Для проверки данной гипотезы был исследован эффект СТА на уровень активности альдегиддегидрогеназы, играющей важную роль в детоксикации антинеопластических препаратов и подавлении вызванного ими окислительного стресса [19]. Клетки U87 инкубировали в присутствии СТА в концентрациях 0,5 и 1 мкМ в течение 24 ч, после чего проводили их окраску с помощью AldeRed, являющегося флуоресцирующим субстратом ALDH, и анализировали клетки с помощью проточной цитометрии. Как видно из цитограмм, представленных на рис. 3, в, в контроле отсутствовали клетки с высоким уровнем активности ALDH (клетки $ALDH^{high}$; 0,3%), в то время как СТА в концентрациях 0,5 и 1 мкМ вызывал увеличение доли клеток $ALDH^{high}$ до 17,5% и 50,7% соответственно. Внесение в культуральную среду селективного ингибитора ALDH диэтиламинобензальдегида значительно снижало наблюдаемый эффект тритерпеноида, свидетельствуя о том, что выявленное усиление флуоресцентного сигнала клеток в экспериментальных группах связано именно с активностью ALDH (рис. 3, в).

EGFR, ERBB2 и AKT1 являются потенциальными белковыми мишенями СТА, определяющими его выраженную антиглиобластомную активность. Известно, что пентациклические тритерпеноиды, как природные, так и полусинтетические, характеризуются широким спектром молекулярных мишеней внутри клеток [20]. Для того чтобы определить потенциальные белковые мишени СТА, ассоциированные с патогенезом МГБ, был использован комплекс методов компьютерной биологии. На первом этапе на основе анализа структуры СТА с использованием хемоинформатических платформ Polypharmacology Browser 2.0 [9] и SwissTargetPrediction [10] мы идентифицировали ряд его возможных белковых мишеней (рис. 4, а). Параллельно с этим был реконструирован МГБ-ассоциированный регулом на основе ключевых генов, связанных с МГБ, по данным DisGeNET, в который далее внедряли выявленные белки-мишени СТА, анализировали топологию сетей и ранжировали

потенциальные мишени тритерпеноида по уровню взаимодействия с МГБ-ассоциированным регулом. Проведенный анализ показал, что наибольшей взаимосвязью с патогенезом МГБ среди проанализированных белков обладали рецептор эпидермального ростового фактора (EGFR), серин-треониновая протеинкиназа AKT1, тирозиновая протеинкиназа FYN и рецепторная тирозиновая протеинкиназа ERBB2 (известная также как HER2) (рис. 4, а). Дальнейшее молекулярное моделирование подтвердило способность СТА взаимодействовать с активными центрами EGFR, AKT1 и ERBB2 в сайтах связывания их известных ингибиторов с низкими значениями свободной энергии Гиббса ($\Delta G = -9,2, -7,1$ и $-7,0$ ккал/моль соответственно) (рис. 4, б). FYN был исключен из дальнейшего анализа, так как полученный докинг-комплекс СТА с данным белком характеризовался энергией связывания $\Delta G = -5,3$ ккал/моль, значительно превышающей пороговую величину ($\Delta G \leq -7,0$ ккал/моль) (рис. 4, б). Подробный анализ полученных структур показал, что молекула СТА формирует связи с аминокислотными остатками, играющими важную роль в функционировании EGFR, AKT1 и ERBB2, включая водородные связи с Arg858 (EGFR), Glu85 и Cys296 (AKT1), Lys753, Asn850 и Asp863 (ERBB2), причем выявленная сеть взаимодействий СТА оказалась схожей с сетью взаимодействия известных ингибиторов анализируемых белков (рис. 4, в). Последующее нанесение белковых мишеней СТА, верифицированных молекулярным докингом, на филогенетическое дерево, содержащее МГБ-ассоциированный кином человека (реконструированный на основе базы данных Open Targets Platform), независимо подтвердило связь EGFR и ERBB2 с патогенезом МГБ (рис. 4, г). Интересно, что AKT1, несмотря на ее высокий уровень интеграции в МГБ-специфичный регулом (рис. 4, а), оказалась не ассоциированной с патогенезом глиобластомы (рис. 4, г), что, возможно, объясняется сложностями в заполнении базы данных Open Targets Platform информацией по AKT1, так как в большинстве опубликованных работ, посвященных связи АКТ с МГБ, использовались ингибиторы пан-АКТ, обладающие сходной эффективностью действия на различные изоформы АКТ [21]. Несмотря на это, AKT1, по-видимому, играет важную роль в прогрессии МГБ — подавление ее экспрессии с помощью малых интерферирующих РНК и антисмысловых олигонуклеотидов достоверно снижало пролиферацию клеток МГБ в клеточных и мышиных экспериментах соответственно [22, 23].

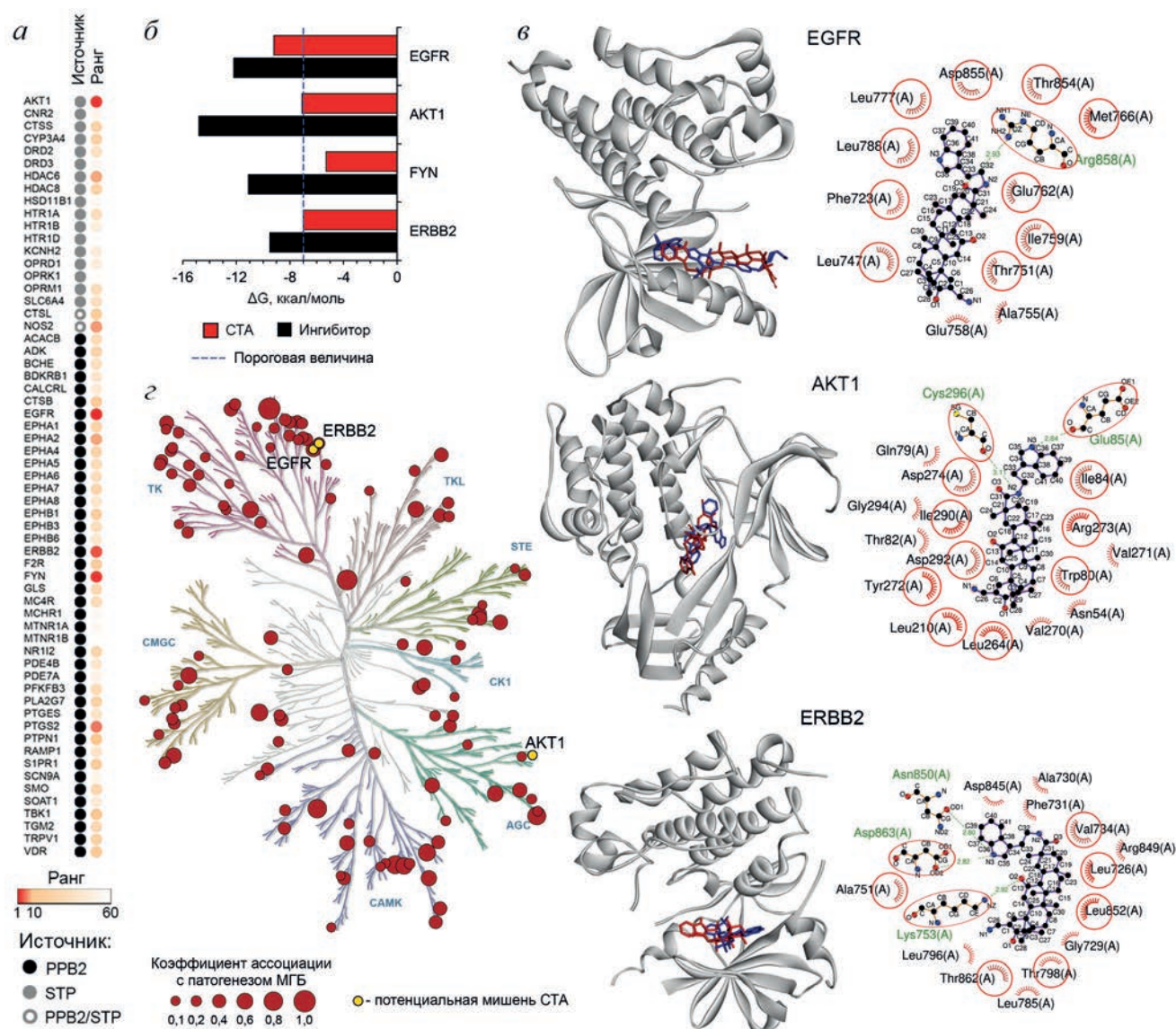


Рис. 4. Определение возможных белковых мишеней СТА, ассоциированных с МГБ. *а* – Анализ интегрированности потенциальных мишеней СТА в регулом МГБ. Первичные мишени СТА были предсказаны с помощью веб-ресурсов Polypharmacology Browser (PPB2) и SwissTargetPrediction (SWT), их взаимодействие с МГБ-ассоциированным регулом было воссоздано на основе информации из баз данных DisGeNET и STRING и проанализировано с помощью плагина cytoHubba в программной среде Cytoscape. Ранг мишени определен на основе трех характеристик центральности гена в генной регуляторной сети (Degree, MCC и Betweenness), и его величина обратно пропорциональна значимости мишени в регуляции МГБ. *б* – Энергии связывания СТА и известных ингибиторов с AKT1 и EGFR, определенные с помощью молекулярного докинга. *в* – Трехмерное и двухмерное изображения докин-г-комплексов EGFR и AKT1 с СТА. Красными окружностями обозначены аминокислотные остатки, являющиеся общими для докин-г-комплексов СТА и известных ингибиторов EGFR и AKT1. Зелеными пунктирными линиями обозначены водородные связи. *г* – Филогенетическое дерево кинома человека, реконструированное с помощью платформы KinMap. Взаимосвязь киназ с патогенезом МГБ восстановлена с использованием базы данных Open Targets Platform [24]

Таким образом, проведенный *in silico* анализ выявил потенциальную способность СТА взаимодействовать с активными центрами ряда киназ, связанных с патогенезом МГБ, включая EGFR, ERBB2 и AKT1. Полученные данные требуют дальнейшего экспериментального подтверждения.

СТА блокирует развитие сети незрелых тонкостенных сосудов и снижает количество соединительнотканых волокон в ткани МГБ. Ранее

на гетеротопической ксенографтной модели глиобластомы U87 нами было показано, что 7-кратная внутривенная инъекция СТА в дозе 20 мг/кг эффективно снижала рост периферических опухолевых узлов, подавляя пролиферативный потенциал опухолевых клеток и модулируя опухолевое микроокружение [7]. Данный эффект в сочетании с установленной нами ранее способностью СТА блокировать васкулогенную мимикрию клеток U87

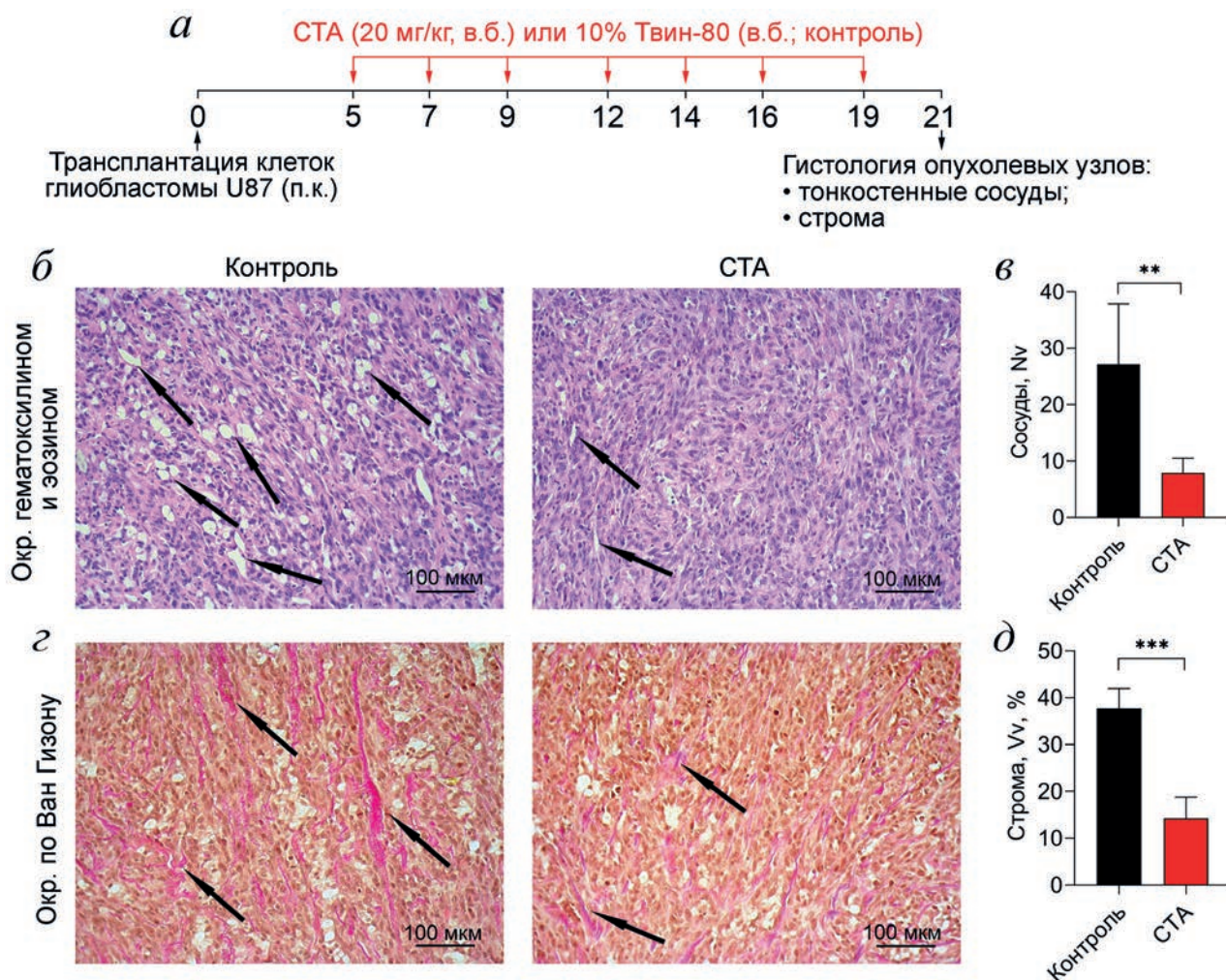


Рис. 5. Эффект СТА на содержание тонкостенных кровеносных сосудов и эластических волокон в опухолевой ткани на ксенографтной модели глиобластомы U87. *а* – Схема эксперимента. Мышам линии Nude подкожно трансплантировали клетки глиобластомы U87. На 5-й день роста опухоли мышам вводили соединение СТА или Tween-80. Всего было проведено 7 инъекций. На 21-й день роста опухоли мышей выводили из эксперимента. *б* – Гистологическое исследование опухолевых узлов. Окрашивание гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 200$. Черными стрелками указаны тонкостенные кровеносные сосуды. *в* – Количественная оценка содержания тонкостенных кровеносных сосудов в ткани глиобластомы U87. Nv – численная плотность структуры. *г* – Анализ соединительнотканых структур в опухолевых узлах. Окрашка по Ван Гизону. Увеличение $\times 200$. *д* – Количественная оценка содержания эластических волокон в ткани глиобластомы U87. Vv – объемная плотность структуры (%)

in vitro [7] побудили нас к проведению детального исследования эффекта СТА на интенсивность ангиогенеза в ткани МГБ на вышеуказанной мышинной модели.

Учитывая тесную морфологическую связь сосудистого и стромального компонентов опухоли, нами была проанализирована представленность не только тонкостенных кровеносных сосудов, но также соединительнотканых волокон в опухолевой ткани мышей с трансплантированной подкожно глиобластомой U87, получавших в.б. инъекции СТА в дозе 20 мг/кг или 10%-ный Tween-80, который использовали в качестве контроля. Схема эксперимента представлена на рис. 5, *а*.

При гистологическом исследовании было выявлено, что ткань глиобластомы U87 содер-

жит большое количество незрелых тонкостенных кровеносных сосудов, пронизывающих опухоль (рис. 5, *б*), численная плотность которых достоверно в 3,4 раза снижалась при терапии СТА по сравнению с контролем (рис. 5, *в*). Наблюдаемый эффект полностью согласуется с показанной нами ранее способностью СТА блокировать процесс формирования тубулярных структур клетками U87 *in vitro* (васкулогенная мимикрия) [7]. Кроме того, гистологическое исследование выявило обширную сеть соединительнотканых волокон в опухолевой ткани, представленность которой значительно обеднялась при введении исследуемого триперпеноида (рис. 5, *г*): объемная плотность окрашенных по Ван Гизону волокон в экспериментальной группе оказалась в 2,7 раза ниже

по сравнению с контролем (рис. 5, *д*). Эти результаты полностью согласуются с выявленной ранее способностью СТА снижать содержание коллагеновых волокон в ткани глиобластомы U87 на мышинной модели [7].

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Учитывая высокий уровень злокачественности МГБ, определяемой не только усиленной клеточной пролиферацией, но также выраженной подвижностью опухолевых клеток, их инвазивностью и предрасположенностью к развитию лекарственной устойчивости [2], одним из многообещающих направлений в области создания новых классов антиглиобластомных препаратов является поиск и синтез соединений, способных оказывать не только прямое токсическое воздействие на клетки МГБ, но также блокировать их прометастатический фенотип [25]. В настоящей работе были продолжены исследования антиглиобластомного потенциала СТА, относящегося к группе полусинтетических пентациклических тритерпеноидов, несущих в кольце А цианоеноновый фармакофорный заместитель и обладающих выраженным комплексным фармакологическим эффектом в отношении опухолевой прогрессии, воспаления и повреждения тканей [20, 26, 27]. В ходе проведенного исследования было установлено, что СТА эффективно ингибирует рост клеток U87 в 3D-культуре (рис. 1, *в–е*), причем данный эффект был показан для цианоенон-содержащих тритерпеноидов впервые – в предыдущих работах антиглиобластомный потенциал соединений данного ряда был оценен лишь на монослойных моделях [28–30], и только в работах Zhou et al. [31], So et al. [32] и Murad et al. [33] был установлен блокирующий эффект CDDO-Me и CDDO-Im на рост сфероидов клеток рака молочной железы и простаты человека. Выявленная способность СТА ингибировать рост клеток U87 в сфероиде хорошо согласуется с его супрессивным эффектом на рост опухолевых узлов на мышинной гетеротопической ксенографтной модели глиобластомы U87, показанным нами ранее [7].

Помимо подавления сфероидного роста, наблюдаемый эффект СТА в отношении повышения адгезивности клеток U87 (рис. 2) также подтверждает его выраженный антиглиобластомный потенциал. Известно, что слабый уровень межклеточной адгезии опухолевых клеток связан с их мезенхимальным фенотипом и играет важную роль в метастазировании [34],

поэтому модулирование данной характеристики опухолевых клеток можно рассматривать в качестве перспективного направления в противоопухолевой терапии [35]. Показанная в настоящей работе способность СТА увеличивать межклеточную адгезию клеток U87 в трипсиновом тесте (рис. 2, *а*), с одной стороны, согласуется со схожим эффектом азиатиковой кислоты в отношении адгезивности клеток рака легких человека A549 [36], однако, с другой стороны, противоречит описанному в работе Tsai et al. [30] ингибирующему эффекту RTA-404 (аналог СТА) в отношении адгезионных свойств клеток U87. Данное несоответствие можно объяснить значительными отличиями в используемых концентрациях тритерпеноидов: в нашей работе эффект СТА был изучен в нетоксичном диапазоне концентраций (25–100 нМ) (рис. 2, *а*), тогда как в работе Tsai et al. [30] влияние RTA-404 на адгезивность клеток U87 исследовалось в концентрации 500 нМ, вызывающей гибель примерно 50% клеток, т.е. наблюдаемое снижение адгезивности клеток МГБ, стимулированных RTA-404, с высокой долей вероятности могло быть вызвано их апоптозом. Помимо межклеточной адгезии, СТА усиливал адгезивность клеток U87 к коллагену, моделирующему внеклеточный матрикс (рис. 2, *б*), что также свидетельствует в пользу его выраженного антиглиобластомного потенциала: ранее Ramaswamy et al. [37] показали подобный эффект в отношении адгезивности клеток U87 к желатину при действии U0126, селективного ингибитора ERK1/2, обладающего выраженными антиглиобластомными свойствами.

Наличие синергизма между цитотоксическими эффектами СТА и ТМЗ на модели клеток U87 (рис. 3, *б*), а также показанная нами ранее способность СТА эффективно накапливаться в тканях головного мозга мышей [7] говорят о потенциальной возможности введения исследуемого тритерпеноида в современные схемы химиотерапии МГБ, однако вызванное им усиление активности ALDH в клетках U87 (рис. 3, *в*) свидетельствует о необходимости тщательного подбора оптимальных дозировок и схем введения СТА. Активация ALDH в опухолевых клетках связана с их цитопротекторным ответом на ксенобиотики, электрофильный и окислительный стресс [38], являясь также ключевым маркером опухолевых стволовых клеток (ОСК) [39]. Учитывая наличие в структуре СТА электрофильного акцептора Михаэля (цианоеноновая группа), его стимулирующий эффект на продукцию активных форм кислорода в клетках U87,

показанный нами ранее [7], и способность ингибировать рост сфероидов клеток U87 (рис. 1, *в–е*), являющихся важным источником ОСК [40], мы предполагаем, что наблюдаемая активация ALDH под действием СТА (рис. 3, *в*) все же является следствием компенсационных механизмов в клетках МГБ в ответ на ксенобиотический стресс, а не маркером усиления их стволовых свойств, что требует дальнейшего экспериментального подтверждения.

Проведенные гистологические исследования срезов опухолевой ткани глиобластомы U87 показали, что СТА способен воздействовать не только напрямую на опухолевые клетки, но и на опухолевое микроокружение, подавляя формирование в ней сети незрелых тонкостенных кровеносных сосудов (рис. 5, *в*), хаотичная разветвленная структура и высокая проницаемость которых формирует в опухолевой ткани очаги гипоксии, способствующие появлению высокозлокачественных клеток МГБ мезенхимального фенотипа, которые и определяют диффузный рост глиобластом [41]. Наблюдаемый супрессорный эффект СТА в отношении тонкостенных кровеносных сосудов, стенки которых представлены не только эндотелиоцитами, но и опухолевыми клетками [42], согласуется с его блокирующим воздействием на формирование тубулярных структур из клеток U87 (васкулогенная мимикрия) *in vitro*, показанный нами ранее [7]. Полученные данные в сочетании с выявленной ранее способностью СТА усиливать экспрессию маркеров зрелых сосудов α -SMA и CD31 в ткани глиобластомы U87 на ксенографтной модели *in vivo* [7] свидетельствуют о нормализации патологического ангиогенеза в опухолевой ткани, что может способствовать сокращению объемов гипоксических зон в ткани МГБ и, как результат, усилению ее чувствительности к химио- и радиотерапии [43]. Наряду с влиянием на рост тонкостенных кровеносных сосудов, СТА также снижал содержание в опухолевом микроокружении соединительнотканых волокон (рис. 5, *г* и *д*), высокая представленность которых формирует барьер для химиопрепаратов, питательных веществ, кислорода и иммунных клеток (иммунные ловушки), который снижает чувствительность клеток МГБ к химио-, радио- и иммунотерапии [44].

Согласно данным компьютерного моделирования, наблюдаемые антиглиобластомные эффекты СТА могут быть основаны на его прямом ингибирующем воздействии на EGFR, ERBB2 и AKT1 (рис. 4, *б* и *в*). Накопленные к настоящему моменту данные подтверждают способность цианоенон-содержащих триггер-

пеноидов эффективно ингибировать сигнальные пути EGFR, ERBB2 и AKT1 в различных опухолевых клетках [20, 45], в том числе в клетках глиобластомы [30, 46]. Более того, Liu et al. [47] экспериментально доказали прямую блокировку киназной активности AKT1 аналогом СТА CDDO-Me, Kim et al. [48] выявили способность CDDO-Me напрямую взаимодействовать с ERBB2, а в нашей недавней работе было установлено, что CDDO-Im способен взаимодействовать с активным центром EGFR с энергией связывания ниже энергии связывания известного ингибитора EGFR эрлотиниба [49]. Учитывая ключевую роль EGFR, ERBB2 и AKT1 в регуляции прогрессии МГБ [50–52], в том числе в приобретении клетками МГБ мезенхимального фенотипа и стволовых свойств [53, 54], выявленная с помощью *in silico* подходов способность СТА формировать комплексы с данными белками требует дальнейшего экспериментального подтверждения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенного исследования было установлено, что СТА обладает выраженным антиглиобластомным потенциалом, опосредуемым как его прямым модулирующим воздействием на клетки МГБ, включая блокировку сфероидного роста, усиление адгезивности и синергичность цитотоксического эффекта с ТМЗ, так и нормализацией ряда параметров опухолевого микроокружения. Полученные данные свидетельствуют о необходимости дальнейшего изучения его эффектов на приобретение клетками МГБ мезенхимального фенотипа и стволовых свойств и позволяют предложить СТА в качестве перспективного мультитаргетного антиглиобластомного кандидата.

Вклад авторов. А.В. Марков — концепция и руководство работой; К.В. Одаренко, А.В. Сенькова, А.А. Ильина — проведение экспериментов; А.В. Марков, А.В. Сенькова — обсуждение результатов исследования; А.В. Марков, К.В. Одаренко, А.В. Сенькова — написание текста; М.А. Зенкова — редактирование текста статьи и общее руководство исследованиями.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 19-74-30011, <https://rscf.ru/project/19-74-30011/>) и базового бюджетного финансирования ИХБФМ СО РАН № 121031300044-5.

Благодарности. Авторы выражают особую признательность с.н.с., к.х.н. Саломатиной О.В. (НИОХ СО РАН) за предоставленный СТА и ведущему инженеру Владимировой А.В. (ИХБФМ СО РАН) за помощь в поддержании клеточных культур.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Все эксперименты на мышинной модели проведены в соот-

ветствии с нормами обращения с животными, изложенными в Директиве Европейского Парламента и Совета ЕС 2010/63/EU от 22 сентября 2010 г. и «Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ Минздрава СССР № 755 от 12 августа 1977 г.). Все эксперименты на животных были одобрены межинститутской Комиссией по биоэтике ИЦиГ СО РАН (протокол № 56 от 10.08.2019 г.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Sanati, M., Binabaj, M. M., Ahmadi, S. S., Aminyavari, S., Javid, H., Mollazadeh, H., Bibak, B., Mohtashami, E., Jamialahmadi, T., Afshari, A. R., and Sahebkar, A. (2022) Recent advances in glioblastoma multiforme therapy: a focus on autophagy regulation, *Biomed. Pharmacother.*, **155**, 113740, doi: 10.1016/j.biopha.2022.113740.
- Torrisi, F., Alberghina, C., D'Aprile, S., Pavone, A. M., Longhitano, L., Giallongo, S., Tibullo, D., Di Rosa, M., Zappalà, A., Cammarata, F. P., Russo, G., Ippolito, M., Cuttone, G., Li Volti, G., Vicario, N., and Parenti, R. (2022) The hallmarks of glioblastoma: heterogeneity, intercellular crosstalk and molecular signature of invasiveness and progression, *Biomedicines*, **10**, 806, doi: 10.3390/biomedicines10040806.
- Cha, G. D., Kang, T., Baik, S., Kim, D., Choi, S. H., Hyeon, T., and Kim, D.-H. (2020) Advances in drug delivery technology for the treatment of glioblastoma multiforme, *J. Control. Release*, **328**, 350-367, doi: 10.1016/j.jconrel.2020.09.002.
- Qazi, M. A., Vora, P., Venugopal, C., Sidhu, S. S., Moffat, J., Swanton, C., and Singh, S. K. (2017) Intratumoral heterogeneity: pathways to treatment resistance and relapse in human glioblastoma, *Ann. Oncol.*, **28**, 1448-1456, doi: 10.1093/annonc/mdx169.
- Sestito, S., Runfola, M., Tonelli, M., Chiellini, G., and Rapposelli, S. (2018) New multitarget approaches in the war against glioblastoma: a mini-perspective, *Front. Pharmacol.*, **9**, 874, doi: 10.3389/fphar.2018.00874.
- Behl, T., Sharma, A., Sharma, L., Sehgal, A., Singh, S., Sharma, N., Zengin, G., Bungau, S., Toma, M. M., Gitea, D., Babes, E. E., Judea Pusta, C. T., and Bumbu, A. G. (2021) Current perspective on the natural compounds and drug delivery techniques in glioblastoma multiforme, *Cancers (Basel)*, **13**, 2765, doi: 10.3390/cancers13112765.
- Markov, A. V., Ilyina, A. A., Salomatina, O. V., Sen'kova, A. V., Okhina, A. A., Rogachev, A. D., Salakhutdinov, N. F., and Zenkova, M. A. (2022) Novel soloxolone amides as potent anti-glioblastoma candidates: design, synthesis, *in silico* analysis and biological activities *in vitro* and *in vivo*, *Pharmaceuticals*, **15**, 603, doi: 10.3390/ph15050603.
- Ianevski, A., Giri, A. K., and Aittokallio, T. (2020) SynergyFinder 2.0: visual analytics of multi-drug combination synergies, *Nucleic Acids Res.*, **48**, W488-W493, doi: 10.1093/nar/gkaa216.
- Awale, M. and Reymond, J. L. (2019) Polypharmacology browser PPB2: target prediction combining nearest neighbors with machine learning, *J. Chem. Inf. Model.*, **59**, 10-17, doi: 10.1021/acs.jcim.8b00524.
- Daina, A., Michielin, O., and Zoete, V. (2019) SwissTargetPrediction: updated data and new features for efficient prediction of protein targets of small molecules, *Nucleic Acids Res.*, **47**, W357-W364, doi: 10.1093/nar/gkz382.
- Szklarczyk, D., Franceschini, A., Wyder, S., Forslund, K., Heller, D., Huerta-Cepas, J., Simonovic, M., Roth, A., Santos, A., Tsafou, K. P., Kuhn, M., Bork, P., Jensen, L. J., and Von Mering, C. (2015) STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life, *Nucleic Acids Res.*, **43**, D447-D452, doi: 10.1093/nar/gku1003.
- Chin, C.-H., Chen, S.-H., Wu, H.-H., Ho, C.-W., Ko, M.-T., and Lin, C.-Y. (2014) cytoHubba: identifying hub objects and sub-networks from complex interactome, *BMC Syst. Biol.*, **8**, S11, doi: 10.1186/1752-0509-8-S4-S11.
- Trott, O., and Olson, A. J. (2010) AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading, *J. Comput. Chem.*, **31**, 455-461, doi: 10.1002/jcc.21334.
- Suhovskih, A. V., Kazanskaya, G. M., Volkov, A. M., Tsidulko, A. Y., Aidagulova, S. V., and Grigorieva, E. V. (2019) Suitability of RNALater solution as a tissue-preserving reagent for immunohistochemical analysis, *Histochem. Cell Biol.*, **152**, 239-247, doi: 10.1007/s00418-019-01799-z.
- Joseph, J. V., Balasubramanian, V., Walenkamp, A., and Krut, F. A. E. (2013) TGF- β as a therapeutic target in high grade gliomas – promises and challenges,

- Biochem. Pharmacol.*, **85**, 478-485, doi: 10.1016/j.bcp.2012.11.005.
16. Peñuelas, S., Anido, J., Prieto-Sánchez, R. M., Folch, G., Barba, I., Cuartas, I., García-Dorado, D., Poca, M. A., Sahuquillo, J., Baselga, J., and Seoane, J. (2009) TGF- β increases glioma-initiating cell self-renewal through the induction of LIF in human glioblastoma, *Cancer Cell*, **15**, 315-327, doi: 10.1016/j.ccr.2009.02.011.
 17. Beri, P., Popravko, A., Yeoman, B., Kumar, A., Chen, K., Hodzic, E., Chiang, A., Banisadr, A., Placone, J. K., Carter, H., Fraley, S. I., Katira, P., and Engler, A. J. (2020) Cell adhesiveness serves as a biophysical marker for metastatic potential, *Cancer Res.*, **80**, 901-911, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-19-1794.
 18. Beltzig, L., Schwarzenbach, C., Leukel, P., Frauenknecht, K. B. M., Sommer, C., Tancredi, A., Hegi, M. E., Christmann, M., and Kaina, B. (2022) Senescence is the main trait induced by temozolomide in glioblastoma cells, *Cancers (Basel)*, **14**, 2233, doi: 10.3390/cancers14092233.
 19. Poturnajova, M., Kozovska, Z., and Matuskova, M. (2021) Aldehyde dehydrogenase 1A1 and 1A3 isoforms – mechanism of activation and regulation in cancer, *Cell. Signal.*, **87**, 110120, doi: 10.1016/j.cellsig.2021.110120.
 20. Markov, A. V., Zenkova, M. A., and Logashenko, E. B. (2017) Modulation of Tumour-related signaling pathways by natural pentacyclic triterpenoids and their semisynthetic derivatives, *Curr. Med. Chem.*, **24**, 1277-1320, doi: 10.2174/0929867324666170112115313.
 21. McDowell, K. A., Riggins, G. J., and Gallia, G. L. (2011) Targeting the AKT pathway in glioblastoma, *Curr. Pharm. Des.*, **17**, 2411-2420, doi: 10.2174/138161211797249224.
 22. Mure, H., Matsuzaki, K., Kitazato, K. T., Mizobuchi, Y., Kuwayama, K., Kageji, T., and Nagahiro, S. (2010) Akt2 and Akt3 play a pivotal role in malignant gliomas, *Neuro. Oncol.*, **12**, 221-232, doi: 10.1093/neuonc/nop026.
 23. Yoon, H., Kim, D. J., Ahn, E. H., Gellert, G. C., Shay, J. W., Ahn, C.-H., and Lee, Y. B. (2009) Antitumor activity of a novel antisense oligonucleotide against Akt1, *J. Cell. Biochem.*, **108**, 832-838, doi: 10.1002/jcb.22311.
 24. Ochoa, D., Hercules, A., Carmona, M., Suveges, D., Gonzalez-Urriarte, A., Malangone, C., Miranda, A., Fumis, L., Carvalho-Silva, D., Spitzer, M., Baker, J., Ferrer, J., Raies, A., Razuvayevskaya, O., Faulconbridge, A., Petsalaki, E., Mutowo, P., Machlitt-Northen, S., Peat, G., McAuley, E., Ong, C. K., Mountjoy, E., Ghousaini, M., Pierleoni, A., Papa, E., Pignatelli, M., Koscielny, G., Karim, M., Schwartzen-truber, J., Hulcoop, D. G., Dunham, I., and McDonagh, E. M. (2021) Open Targets Platform: supporting systematic drug–target identification and prioritisation, *Nucleic Acids Res.*, **49**, D1302-D1310, doi: 10.1093/nar/gkaa1027.
 25. Bazan, N. G., Reid, M. M., Flores, V. A. C., Gallo, J. E., Lewis, W., and Belayev, L. (2021) Multi-prong control of glioblastoma multiforme invasiveness: blockade of pro-inflammatory signaling, anti-angiogenesis, and homeostasis restoration, *Cancer Metastasis Rev.*, **40**, 643-647, doi: 10.1007/s10555-021-09987-x.
 26. Liby, K. T., and Sporn, M. B. (2012) Synthetic ole-anane triterpenoids: multifunctional drugs with a broad range of applications for prevention and treatment of chronic disease, *Pharmacol. Rev.*, **64**, 972-1003, doi: 10.1124/pr.111.004846.
 27. Sen'kova, A. V., Savin, I. A., Odarenko, K. V., Salomatina, O. V., Salakhutdinov, N. F., Zenkova, M. A., and Markov, A. V. (2023) Protective effect of soloxolone derivatives in carrageenan- and LPS-driven acute inflammation: Pharmacological profiling and their effects on key inflammation-related processes, *Biomed. Pharmacother.*, **159**, 114231, doi: 10.1016/j.biopha.2023.114231.
 28. Tsai, T.-H., Lieu, A.-S., Huang, T.-Y., Kwan, A.-L., Lin, C.-L., and Hsu, Y.-C. (2021) Induction of mitosis delay and apoptosis by CDDO-TFEA in glioblastoma multiforme, *Front. Pharmacol.*, **12**, 756228, doi: 10.3389/fphar.2021.756228.
 29. Tsai, T. H., Hsu, Y. C., Lieu, A. S., Huang, T. Y., Kwan, A. L., and Lin, C. L. (2021) RTA404, an activator of Nrf2, activates the checkpoint kinases and induces apoptosis through intrinsic apoptotic pathway in malignant glioma, *J. Clin. Med.*, **10**, 4805, doi: 10.3390/jcm10214805.
 30. Tsai, T.-H., Lieu, A.-S., Wang, Y.-W., Yang, S.-F., Hsu, Y.-C., and Lin, C.-L. (2021) Therapeutic potential of RTA 404 in human brain malignant glioma cell lines via cell cycle arrest via p21/AKT signaling, *Biomed Res. Int.*, **2021**, 5552226, doi: 10.1155/2021/5552226.
 31. Zhou, L., Wang, Z., Yu, S., Xiong, Y., Fan, J., Lyu, Y., Su, Z., Song, J., Liu, S., Sun, Q., and Lu, D. (2020) CDDO-Me elicits anti-breast cancer activity by targeting LRP6 and FZD7 receptor complex, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **373**, 149-159, doi: 10.1124/jpet.119.263434.
 32. So, J. Y., Lin, J. J., Wahler, J., Liby, K. T., Sporn, M. B., and Suh, N. (2014) A synthetic triterpenoid CDDO-Im inhibits tumorsphere formation by regulating stem cell signaling pathways in triple-negative breast cancer, *PLoS One*, **9**, e107616, doi: 10.1371/journal.pone.0107616.
 33. Murad, H. Y., Chandra, P. K., Kelly, C. A., Khurana, N., Yu, H., Bortz, E. P., Hong, S. N., Mondal, D., and Khismatullin, D. B. (2022) Pre-exposure to stress-inducing agents increase the anticancer efficacy of focused ultrasound against aggressive prostate cancer cells, *Antioxidants*, **11**, 341, doi: 10.3390/antiox11020341.

34. Le Bras, G. F., Taubenslag, K. J., and Andl, C. D. (2012) The regulation of cell–cell adhesion during epithelial-mesenchymal transition, motility and tumor progression, *Cell Adh. Migr.*, **6**, 365–373, doi: 10.4161/cam.21326.
35. Janiszewska, M., Primi, M. C., and Izard, T. (2020) Cell adhesion in cancer: beyond the migration of single cells, *J. Biol. Chem.*, **295**, 2495–2505, doi: 10.1074/jbc.REV119.007759.
36. Cui, Q., Ren, J., Zhou, Q., Yang, Q., and Li, B. (2019) Effect of asiatic acid on epithelial-mesenchymal transition of human alveolar epithelium A549 cells induced by TGF- β 1, *Oncol. Lett.*, **17**, 4285–4292, doi: 10.3892/ol.2019.10140.
37. Ramaswamy, P., Nanjaiah, N. D., and Borkotokey, M. (2019) Role of MEK-ERK signaling mediated adhesion of glioma cells to extracellular matrix: possible implication on migration and proliferation, *Ann. Neurosci.*, **26**, 52–56, doi: 10.5214/ans.0972.7531.260203.
38. Singh, S., Bocker, C., Koppaka, V., Chen, Y., Jackson, B. C., Matsumoto, A., Thompson, D. C., and Vasiliou, V. (2013) Aldehyde dehydrogenases in cellular responses to oxidative/electrophilic stress, *Free Radic. Biol. Med.*, **56**, 89–101, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.11.010.
39. Rodriguez, S. M., Staicu, G.-A., Sevastre, A.-S., Baloi, C., Ciubotaru, V., Dricu, A., and Tataranu, L. G. (2022) Glioblastoma stem cells – useful tools in the battle against cancer, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 4602, doi: 10.3390/ijms23094602.
40. Wang, X., Zhou, W., Li, X., Ren, J., Ji, G., Du, J., Tian, W., Liu, Q., and Hao, A. (2020) Graphene oxide suppresses the growth and malignancy of glioblastoma stem cell-like spheroids via epigenetic mechanisms, *J. Transl. Med.*, **18**, 200, doi: 10.1186/s12967-020-02359-z.
41. Angara, K., Borin, T. F., and Arbab, A. S. (2017) Vascular mimicry: a novel neovascularization mechanism driving anti-angiogenic therapy (AAT) resistance in glioblastoma, *Transl. Oncol.*, **10**, 650–660, doi: 10.1016/j.tranon.2017.04.007.
42. Viallard, C., and Larrivée, B. (2017) Tumor angiogenesis and vascular normalization: alternative therapeutic targets, *Angiogenesis*, **20**, 409–426, doi: 10.1007/s10456-017-9562-9.
43. Zheng, R., Li, F., Li, F., and Gong, A. (2021) Targeting tumor vascularization: promising strategies for vascular normalization, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **147**, 2489–2505, doi: 10.1007/s00432-021-03701-8.
44. Mohiuddin, E. and Wakimoto, H. (2021) Extracellular matrix in glioblastoma: opportunities for emerging therapeutic approaches, *Am. J. Cancer Res.*, **11**, 3742–3754.
45. Konopleva, M., Zhang, W., Shi, Y. X., McQueen, T., Tsao, T., Abdelrahim, M., Munsell, M. F., Johansen, M., Yu, D., Madden, T., Safe, S. H., Hung, M. C., and Andreeff, M. (2006) Synthetic triterpenoid 2-cyano-3,12-dioxooleana-1,9-dien-28-oic acid induces growth arrest in HER2-overexpressing breast cancer cells, *Mol. Cancer Ther.*, **5**, 317–328, doi: 10.1158/1535-7163.MCT-05-0350.
46. Gao, X., Deeb, D., Jiang, H., Liu, Y., Dulchavsky, S. A., and Gautam, S. C. (2007) Synthetic triterpenoids inhibit growth and induce apoptosis in human glioblastoma and neuroblastoma cells through inhibition of prosurvival Akt, NF- κ B and Notch1 signaling, *J. Neurooncol.*, **84**, 147–157, doi: 10.1007/s11060-007-9364-9.
47. Liu, Y., Gao, X., Deeb, D., and Gautam, S. C. (2012) Oleanane triterpenoid CDDO-Me inhibits Akt activity without affecting PDK1 kinase or PP2A phosphatase activity in cancer cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **417**, 570–575, doi: 10.1016/j.bbrc.2011.12.007.
48. Kim, E.-H. H., Deng, C., Sporn, M. B., Royce, D. B., Risingsong, R., Williams, C. R., and Liby, K. T. (2012) CDDO-methyl ester delays breast cancer development in Brca1-mutated mice, *Cancer Prev. Res.*, **5**, 89–97, doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-11-0359.
49. Markov, A. V., Odarenko, K. V., Ilyina, A. A., and Zenkova, M. A. (2022) Uncovering the anti-angiogenic effect of semisynthetic triterpenoid CDDO-Im on HUVECs by an integrated network pharmacology approach, *Comput. Biol. Med.*, **141**, 105034, doi: 10.1016/J.COMPBIOMED.2021.105034.
50. Westphal, M., Maire, C. L., and Lamszus, K. (2017) EGFR as a target for glioblastoma treatment: an unfulfilled promise, *CNS Drugs*, **31**, 723–735, doi: 10.1007/s40263-017-0456-6.
51. Majewska, E., and Szeliga, M. (2017) AKT/GSK3 β signaling in glioblastoma, *Neurochem. Res.*, **42**, 918–924, doi: 10.1007/s11064-016-2044-4.
52. Vitanza, N. A., Johnson, A. J., Wilson, A. L., Brown, C., Yokoyama, J. K., Künkele, A., Chang, C. A., Rawlings-Rhea, S., Huang, W., Seidel, K., Albert, C. M., Pinto, N., Gust, J., Finn, L. S., Ojemann, J. G., Wright, J., Orentas, R. J., Baldwin, M., Gardner, R. A., Jensen, M. C., and Park, J. R. (2021) Locoregional infusion of HER2-specific CAR T cells in children and young adults with recurrent or refractory CNS tumors: an interim analysis, *Nat. Med.*, **27**, 1544–1552, doi: 10.1038/s41591-021-01404-8.
53. Takashima, Y., Kawaguchi, A., and Yamanaka, R. (2019) Promising prognosis marker candidates on the status of epithelial–mesenchymal transition and glioma stem cells in glioblastoma, *Cells*, **8**, 1312, doi: 10.3390/cells8111312.
54. Barzegar Behrooz, A., Talaie, Z., Jusheghani, F., Łos, M. J., Klonisch, T., and Ghavami, S. (2022) Wnt and PI3K/Akt/mTOR survival pathways as therapeutic targets in glioblastoma, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 1353, doi: 10.3390/ijms23031353.

EVALUATION OF THE ANTITUMOR POTENTIAL OF SOLOXOLONE TRYPTAMIDE AGAINST GLIOBLASTOMA MULTIFORME USING *in silico*, *in vitro* AND *in vivo* APPROACHES

A. V. Markov*, K. V. Odarenko, A. V. Sen'kova, A. A. Ilyina, and M. A. Zenkova

Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 630090 Novosibirsk, Russia; e-mail: andmrkv@gmail.com

Glioblastoma multiforme (GBM) is a highly aggressive neoplasia characterized by uncontrollable diffusive growth, development of resistance to chemo- and radiotherapy and a high rate of recurrence that leads to low survival of patients with GBM. Given the number of signaling pathways regulating GBM pathogenesis, the development of novel anti-glioblastoma compounds based on multitarget natural metabolites is a promising direction for the study. In the current work, the antitumor potential of semisynthetic triterpenoid soloxolone tryptamide (STA) against human glioblastoma U87 cells was explored. It was found that STA effectively blocked the growth of U87 cells in 2D and 3D culture systems, enhanced the adhesiveness of tumor cells and displayed synergistic cytotoxicity with temozolomide. Performed *in silico* analysis revealed that the pronounced anti-glioblastoma activity of STA can be explained by its direct interaction with EGFR, ERBB2 and AKT1, which play an important role in the regulation of GBM malignancy. Along with observed direct modulatory action of STA on U87 cells, explored compound had a normalizing effect on the tumor microenvironment in murine heterotopic U87 xenograft model, suppressing the development of immature blood vessels and the production of elastin in tumor tissue. Taken together, obtained results clearly demonstrate that STA can be considered a novel promising antitumor candidate for GMB treatment.

Keywords: glioblastoma multiforme, cyanoenone pharmacophore, pentacyclic triterpenoids, spheroids, angiogenesis, synergistic effect, molecular docking, gene network, tumor microenvironment

БЕЛОК-БЕЛКОВЫЕ ИНТЕРФЕЙСЫ КАК МИШЕНИ ЛЕКАРСТВ: ОБЩИЙ ДЛЯ ПИРИДОКСАЛЬ-5'-ФОСФАТ-ЗАВИСИМЫХ ФЕРМЕНТОВ МОТИВ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ КОФЕРМЕНТА ОТ ЕГО ПРОДУЦЕНТОВ

© 2023 В.А. Алешин^{1,2}, В.И. Буник^{1,2,3*}

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, отдел биокинетики,
119234 Москва, Россия; электронная почта: bunik@belozersky.msu.ru

² Сеченовский Университет, кафедра биохимии, 119048 Москва, Россия

³ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
факультет биоинженерии и биоинформатики, 119234 Москва, Россия

Поступила в редакцию 08.02.2023

После доработки 22.03.2023

Принята к публикации 10.04.2023

Пиридоксаль-5'-фосфат (PLP), фосфорилированная форма витамина В6, является коферментом многочисленных реакций, включая те, что меняются и/или имеют прогностическое значение при раке. Вследствие высокой реакционной способности PLP, в том числе к клеточным белкам, предполагается, что он может напрямую передаваться от белков-доноров к использующим его акцепторам. Цель данной работы состоит в идентификации предполагаемого данной гипотезой интерфейса для связывания ограниченного числа доноров PLP, а именно пиридоксалькиназы (PdxK), пиридокс(ам)ин-5'-фосфатоксидазы (PNPO) и PLP-связывающего белка (PLPBP), множеством PLP-зависимых ферментов. Экспериментально подтвержденные комплексы между донорами и акцепторами PLP показывают взаимодействие PdxK и PNPO с наиболее представленными структурными типами акцепторов PLP (типы I и II), а PLPBP — с акцепторами редких структурных типов III и V. Общий мотив во множестве PLP-зависимых ферментов типов I и II определен путем выравнивания последовательностей и трехмерных структур экспериментально подтвержденных партнеров PdxK и PNPO. Мотив простирается от поверхности PLP-зависимых ферментов до центров связывания PLP и представлен поверхностной альфа-спиралью, частично скрытым бета-тяжом и неупорядоченными участками структуры. Патогенность мутаций ферментов человека в мотиве или рядом с ним, но вне активных центров подтверждает функциональное значение мотива, который может быть интерфейсом для переноса кофермента в комплексах PLP-зависимых ферментов с ферментами синтеза PLP. Специфические аминокислотные остатки этого общего мотива могут быть использованы для создания селективных ингибиторов доставки кофермента PLP-зависимым ферментам, критически важным для пролиферации опухолевых клеток.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: CBS, PdxK, PNPO, PLPBP, пиридоксаль-5'-фосфат-зависимый фермент, TAT, метаболизм витамина В6, метаболизм аминокислот, метаболизм одноуглеродных фрагментов.

DOI: 10.31857/S0320972523070138, EDN: FYKHQZ

ВВЕДЕНИЕ

Ферменты, использующие пиридоксаль-5'-фосфат (PLP) в качестве кофермента, имеют более 300 различных каталитических функций и принадлежат к пяти из семи существующих

ЕС-классов [1]. Многие из этих реакций, в особенности те, которые связаны с метаболизмом аминокислот, имеют решающее значение не только для метаболических перестроек, лежащих в основе злокачественной трансформации, но и для элиминации злокачественных клеток.

Принятые сокращения: ABAT — ГАМК-трансаминаза; CBS — цистатионин β-синтаза; dpaL — диаминопропионат-аммиак-лиаза; GOT — аспаратаминотрансфераза; PdxK — пиридоксалькиназа; PL — пиридоксаль; PLP — пиридоксаль-5'-фосфат; PLPBP — PLP-связывающий белок, также известный как PROSC; PNPO — пиридокс(ам)ин-5'-фосфат-оксидаза; SHMT — серингидроксиметилтрансфераза; SDSL — сериндегидратаза-подобный белок; SRR — серинацемаза; TAT — тирозинаминотрансфераза.

* Адресат для корреспонденции.

Например, PLP-зависимые трансаминазы управляют активацией и дифференцировкой Т-клеток, необходимых для противоопухолевого ответа [2]. Снижение уровня PLP-зависимой тирозинаминотрансферазы (TAT), кодируемой геном *TAT*, определяет патогенность гепатоцеллюлярной карциномы [3], при этом низкая экспрессия катаболических ферментов тирозина предсказывает неблагоприятный исход [4]. Различные типы рака демонстрируют изменения в экспрессии PLP-зависимой цистатинин- β -синтазы (CBS), связанные с неблагоприятным прогнозом, что соответствует существенной роли фермента в метаболизме одноуглеродных фрагментов, включающих реакции метилирования и транссульфурирования [5, 6].

PLP является основным компонентом пула витаминов В₆, содержание которого в сыворотке крови и эритроцитах соответствует диапазону микромолярных концентраций [7, 8]. PLP гидролизуется до пиридоксала (PL) либо неферментативно, либо с помощью многочисленных фосфатаз, включая PLP-специфическую фосфатазу (PLPP или хронофин), которая находится под контролем индуцируемого гипоксией транскрипционного фактора HIF1, регулирующего метаболизм Т-клеток [2]. В качестве белков-доноров PLP известны два продуцирующих PLP фермента — пиридоксалькиназа (PdxK, ген *PDXK*) и пиридокс(ам)ин-5'-фосфатоксидаза (PNPO, ген *PNPO*) — и PLP-связывающий белок (PLPBP, ген *PLPBP*), который связывает PLP ковалентно с образованием основания Шиффа между альдегидной группой PLP и остатком лизина PLPBP [9–11].

При раке изменяются как PLP-зависимые реакции, так и метаболизм витамина В₆. Маркеры вызванной воспалением деградации предшественника PLP пиридоксала коррелируют с заболеваемостью раком, особенно для рака легкого, в значительной степени обусловленного воспалением [12]. Образование PLP из PL с помощью PdxK и активности PLP-зависимой орнитиндекарбоксилазы (ген *ODC1*) и митохондриальной аспартатаминотрансферазы (ген *GOT2*) являются ключевыми для пролиферации клеток миелоидного лейкоза [13]. В отличие от уровня мРНК PdxK, уровень самого фермента увеличивается при раке легкого, и это увеличение коррелирует с хорошим прогнозом [14]. В целом, анализ изменений метаболизма витамина В₆ в различных раковых клетках указывает на очень сложную взаимосвязь между его изменениями и прогнозом заболевания. Так, дефицит В₆ вреден для раковых клеток, но он также способствует

злокачественной трансформации нормальных клеток, стимулируя повреждение в них ДНК и ослабляя иммунный ответ [15]. Фармакологическая регуляция специфических PLP-зависимых реакций может предоставить новые инструменты для селективной борьбы с различными видами рака, поскольку они существенно зависят от некоторых из этих реакций. Несмотря на ряд известных ингибиторов PLP-зависимых ферментов, создание новых ингибиторов для эффективной регуляции PLP-зависимых процессов *in vivo* продолжается [16].

И PLP, и его каталитически неактивный предшественник PL представляют собой реакционноспособные альдегиды, которые могут модифицировать группы $-NH_2$ в белках и низкомолекулярных соединениях. Последние включают аминоксиуксусную кислоту, широко используемую для ингибирования PLP-зависимых трансаминаз. Химическая реакционная способность объясняет токсичность PLP и PL в чрезмерных концентрациях. Например, в концентрации 0,5 мМ эти витамины намного эффективнее убивают различные раковые клетки, чем пиридоксамин или пиридоксин [17]. В этой связи было высказано предположение, что в биосистемах PLP передается непосредственно от белков-доноров к ферментам, использующим PLP в качестве кофермента (акцепторам PLP) [18–20]. Однако среди ферментов, использующих PLP в качестве кофермента, выделяют до семи структурных типов без значительной гомологии [1, 21]. Таким образом, в рамках гипотезы о прямой передаче PLP три известных белка-донора PLP — PdxK, PNPO и PLPBP — должны образовывать специфические комплексы со множеством структурно разных белков-акцепторов PLP. Другими словами, гипотеза подразумевает существование подмножеств акцепторов PLP с общими структурными мотивами, позволяющими каждому подмножеству связывать PdxK, и/или PNPO, и/или PLPBP. Цель данной работы — обнаружить такие структурные мотивы, подразумеваемые гипотезой о прямом переносе PLP от его доноров к акцепторам, в множестве структурно различных акцепторов PLP. Для этого после идентификации экспериментально подтвержденных взаимодействий между акцепторами и донорами PLP мы определили локальное сходство негомологичных белков-акцепторов PLP, взаимодействующих с тем или иным донором, используя информацию о последовательностях и трехмерных структурах акцепторов. В результате был обнаружен общий мотив наиболее представленных структурных типов PLP-зависимых ферментов (типы I и II), который может

служить интерфейсом для связывания PdxK или PNPO с последующим переносом PLP от этих доноров к акцепторам типов I и II.

Функциональная значимость найденного мотива подтверждается патогенными мутациями аминокислотных остатков внутри мотива или рядом с ним, не входящих в активные центры ферментов. Такие мутации известны для моногенных заболеваний, связанных с вариантами PLP-зависимой цистатионин- β -синтазы или тирозинаминотрансферазы человека [22, 23]. Поскольку измененная экспрессия этих ферментов связана со злокачественной трансформацией и плохим прогнозом, фармакологическая регуляция белок-белковых взаимодействий, участвующих в переносе PLP в активные центры этих ферментов, может представлять собой новую стратегию разработки специфических ингибиторов отдельных PLP-зависимых реакций. Такая стратегия может быть основана на существовании специфических для отдельных PLP-зависимых ферментов аминокислотных остатков в структуре общего для типов I и II мотива.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Биоинформатический поиск мотива. Для поиска консервативных мотивов в PLP-зависимых ферментах на основе последовательностей использовали программу GLAM2, версии 5.4.1 [24], доступную на онлайн-сервере (<https://meme-suite.org>, по состоянию на 25 сентября 2022 г.). Получая в качестве входных данных выбранные последовательности, этот алгоритм находит мотивы через локальные выравнивания с гэпами. Входные последовательности были определены нашим поиском опубликованных данных об экспериментально выявленных взаимодействиях с донорами PLP. Использовались рекомендуемые параметры алгоритма, но мотив должен был находиться во всех последовательностях.

Визуализация и выравнивание структур. PyMOL v1.7 (PyMOL Molecular Graphics System, Schrödinger, LLC.) использовалась для визуализации белков, как описано в подписях к соответствующим рисункам. Белки представлены в виде моделей с разными цепями, показанными разными оттенками серого. Для ионов или лигандов используется стандартный цветовой код. Структуры загружаются из банка данных белков PDB. При необходимости использовали Protein-BLAST [25] для идентификации гомологов белков, имеющих в базе данных.

Для получения последовательностей белков структурного типа II млекопитающих, соответствующих мотиву белка диаминопропионат-аммиак-лиазы (draL), использовали выравнивание структур в программе PyMOL. Последовательности, соответствующие мотиву draL, в дальнейшем использовались для подготовки «лого» с помощью GLAM2.

Множественное выравнивание последовательностей. Множественное выравнивание последовательностей Clustal Omega [26] применялось для выравнивания последовательностей гомологичных белков (общая идентичность >30%).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Взаимодействия PNPO, PdxK и PLPBP с PLP-зависимыми ферментами. Наш поиск по публикациям и находящимся в открытом доступе базам данных белок-белковых взаимодействий (BioGrid [27], IntAct [28], String [29]) выявил экспериментально подтвержденные физические взаимодействия между PLP-связывающими белками и тремя известными белками-донорами PLP (таблица).

Девять из двенадцати подтвержденных взаимодействий относятся к PLP-зависимым ферментам структурного типа I, т.е. к наиболее распространенному типу, включающему более 75% PLP-зависимых белков [1]. Однако среди подтвержденных партнеров доноров PLP есть и представители PLP-зависимых белков менее распространенных структурных типов II, III и V (таблица). Найденные взаимодействия показывают, что белки структурного типа I взаимодействуют с PdxK, PNPO или с обоими ферментами, синтезирующими PLP (таблица). С другой стороны, наиболее изученный донор PLP — PdxK, для которой выявлено наибольшее количество белков-партнеров, демонстрирует связывание PLP-зависимых ферментов структурно различных типов I и II (таблица). Наконец, два известных партнера PLPBP, включая самого PLPBP, претерпевающего гомоолигомеризацию, относятся к разным структурным типам III и V. Кодируемый *PLPBP* белок и его бактериальные ортологи демонстрируют высокое структурное сходство с *N*-концевым доменом некоторых PLP-зависимых ферментов, таких как бактериальная аланинрацемемаза и эукариотическая орнитиндекарбоксилаза, но для PLPBP не было обнаружено ферментативной активности [34, 35].

Таким образом, опубликованные данные о подтвержденных взаимодействиях между

Экспериментально подтвержденные взаимодействия PLP-зависимых ферментов с белками-донорами PLP

Донор PLP	№	PLP-зависимый фермент	Организм, метод идентификации	Тип	Ссылка
PdxK	1	4-аминобутиратаминотрансфераза, <i>ABAT</i> , P80404, EC: 2.6.1.19	человек, ко-фракционирование и масс-спектрометрия	I	[30]
	2	орнитинаминотрансфераза, <i>OAT</i> , P04181, EC: 2.6.1.13	человек, ко-фракционирование и масс-спектрометрия	I	[30]
	3	аспартатаминотрансфераза, <i>GOT1</i> , W5PS88, EC: 2.6.1.1	овца, эмиссионная анизотропия и аффинная хроматография	I	[31]
	4	аланинаминотрансфераза, <i>GPT</i> , A0A287BMB4, EC: 2.6.1.2	свинья, поляризация флуоресценции и поверхностный плазмонный резонанс	I	[20]
	5	глутаматдекарбоксилаза, <i>GAD1</i> , P48319, EC: 4.1.1.15	свинья, поляризация флуоресценции и поверхностный плазмонный резонанс	I	[20]
	6	серингидроксиметилтрансфераза, <i>glyA</i> , Q7SIB6, EC: 2.1.2.1	<i>Geobacillus stearothermophilus</i> , поверхностный плазмонный резонанс	I	[32]
	7	Диаминопропионат-аммиак-лиаза, <i>dpaL</i> , P40817, EC: 4.3.1.15	<i>Salmonella typhimurium</i> , поверхностный плазмонный резонанс	II	[32]
PNPO	8	серингидроксиметилтрансфераза, <i>SHMT1</i> , P07511, EC: 2.1.2.1	кролик, поляризация и кинетика флуоресценции	I	[33]
	9	аспартатаминотрансфераза, <i>aspC</i> , P00509, EC: 2.6.1.1	<i>Escherichia coli</i> , поляризация флуоресценции и кинетика	I	[33]
	10	L-треонинальдолаза, <i>ltaE</i> , P75823, EC: 4.1.2.48	<i>E. coli</i> , поляризация флуоресценции и кинетика	I	[33]
PLPBP	11	гликогенфосфорилаза, <i>PYGB</i> , P11216, EC: 2.4.1.1	человек, химическая сшивка и масс-спектрометрия	V	[34]
	12	белок гомеостаза PLP, <i>PLPBP</i> , O94903	человек, химическая сшивка и масс-спектрометрия	III	[34]

Примечание. PLP-зависимые ферменты приведены вместе с названиями кодирующих их генов и идентификаторами Uniprot.

белками-донорами и акцепторами PLP показывают: (1) PdxK может направлять свой продукт PLP к ферментам-акцепторам структурных типов I и II; (2) PdxK и PNPO могут иметь общих партнеров среди ферментов-акцепторов структурного типа I; (3) PLPBP взаимодействует с белками-акцепторами PLP более редких структурных типов III и V.

Анализ последовательностей на предмет локального сходства с использованием GLAM2 (версия 5.4.1) [24] выявил мотив, общий для всех PLP-зависимых партнеров PdxK (таблица, №№ 1–7), показанный на рис. 1, а. В хорошем соответствии с существованием общих партнеров PdxK и PNPO, таких как серингидроксиметилтрансфераза (SHMT) и аспартатаминотрансфераза (GOT) (таблица), сходный мотив был обнаружен при поиске с использованием последовательностей партне-

ров и PNPO, и PdxK (рис. 1, б). В этом случае мотив становится на пять остатков короче на N-конце и на два остатка длиннее — на C-конце (рис. 1, панель б в сравнении с панелью а). То есть объединение партнеров PdxK и PNPO слегка модифицирует лишь концевые части мотива, не затрагивая его основную часть.

Сравнение рис. 1, з и 1, д показывает, что найденный мотив, общий для всех партнеров PdxK и PNPO, имеет сходную вторичную структуру в PLP-зависимых ферментах разных структурных типов I и II. Мотив представлен альфа-спиралью, бета-цепью и соединительной и C-концевой петлями. Мотив в структурах всех перечисленных в таблице партнеров, взаимодействующих с PdxK и PNPO, показан на дополнительном рис. S1 в Приложении. Примечательно, что в ферментах структурного типа I обнаруженный мотив был ранее

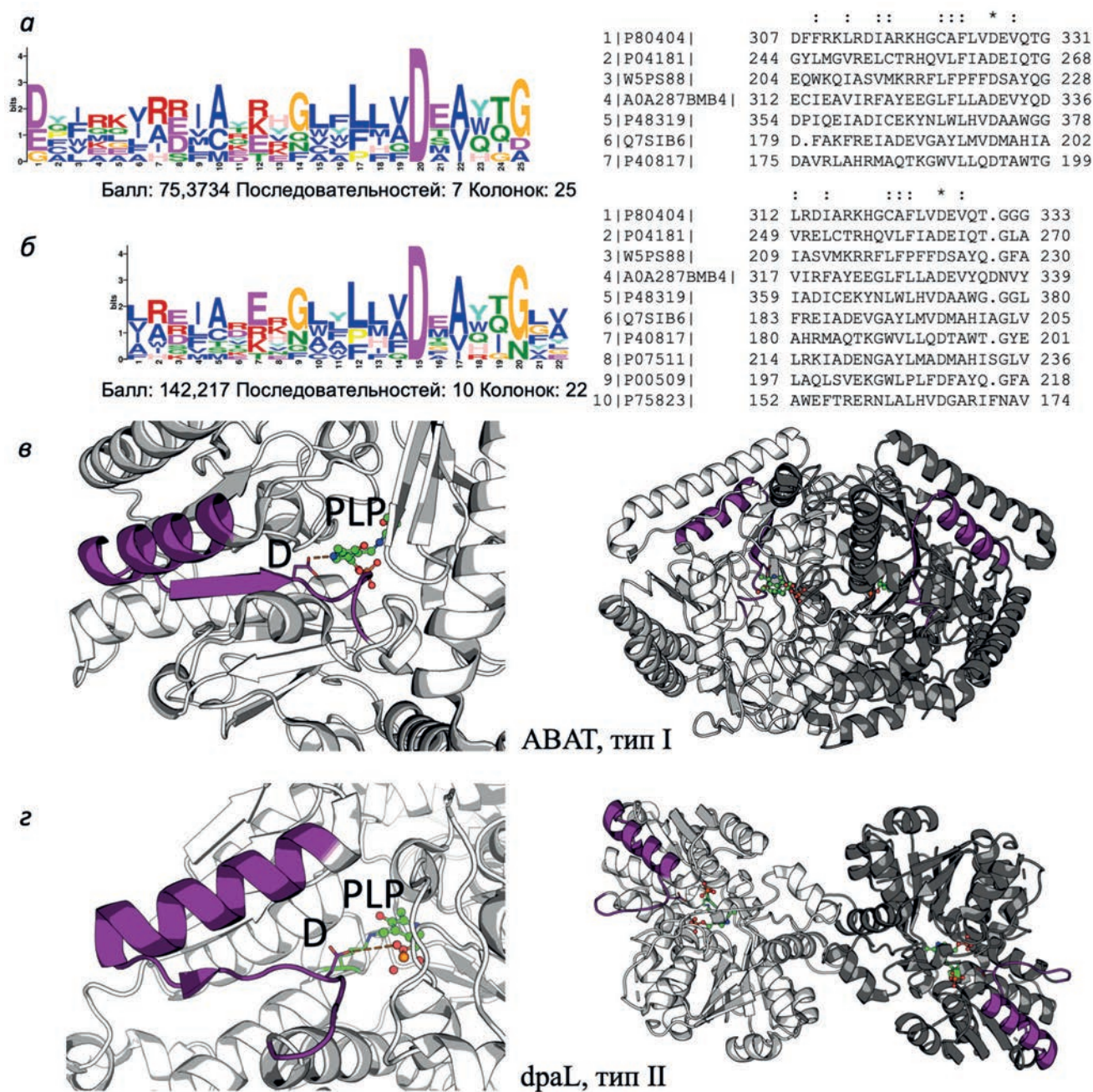


Рис. 1. Общий идентифицированный GLAM2 мотив PLP-связывающих ферментов, которые взаимодействуют с донорами PLP – PdxK и PNPO. *a* – Логотип и последовательности мотива, обнаруженные в связывающихся с PdxK ферментах млекопитающих и бактерий; *б* – логотип и последовательности мотива, обнаруженные в связывающихся с PdxK и PNPO ферментах млекопитающих и бактерий. *в* – Детальный вид мотива (слева) и его локализации в димерной структуре (справа) ГАМК-трансаминазы (ABAT, тип I, структура: 4ZSW); *г* – детальный вид мотива (слева) и его локализация в димерной структуре (справа) диаминопропионат-аммиак-лиазы (draL, тип II, структура: 5YGR). Номера последовательностей на панелях (*a*) и (*б*) идентичны таковым в таблице

идентифицирован как специфический именно для этого типа структурный элемент, причем у этих ферментов конец бета-тяжа включает консервативный остаток аспартата, который взаимодействует с PLP [21, 36]. В результате нашей работы этот общий мотив был найден и в ферментах структурного типа II, которые взаимодействуют с теми же донорами PLP,

что и ферменты структурного типа I (таблица, рис. 1). Важно отметить, что спираль и петли мотива доступны окружающей среде и в димерных формах ферментов (рис. 1, *г* и *д*; дополнительный рис. S1 в Приложении), что указывает на возможность участия обнаруженного общего мотива в гетерологических белок-белковых взаимодействиях.

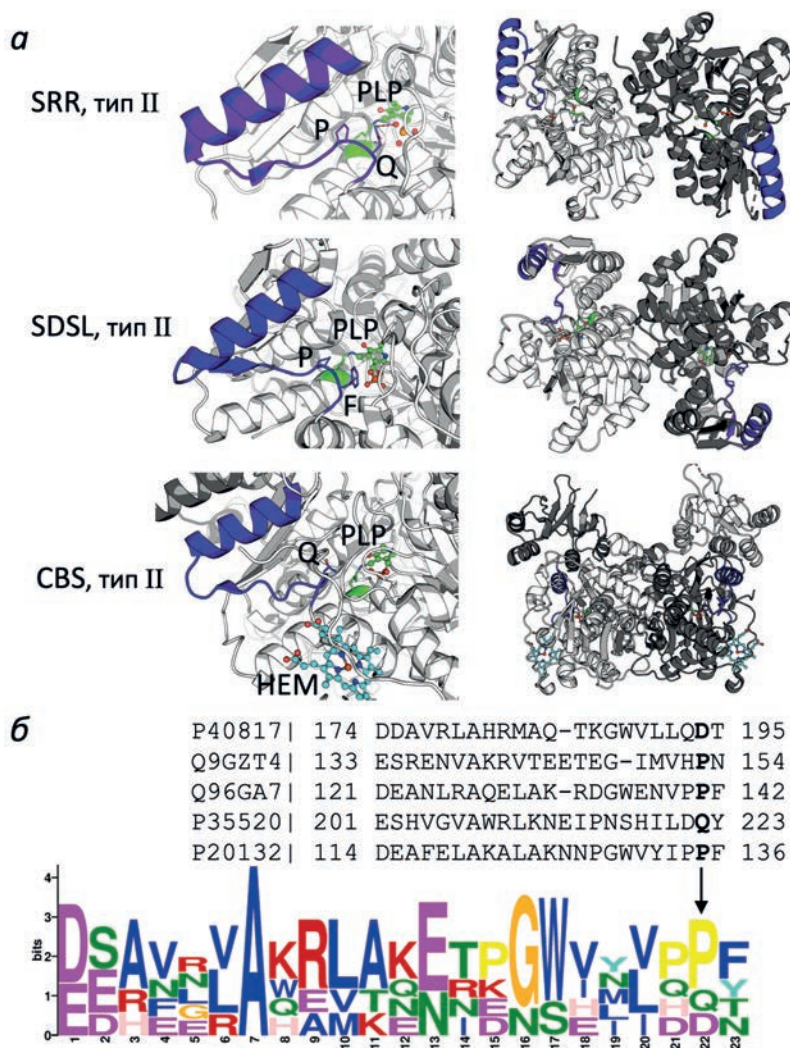


Рис. 2. Идентификация общего мотива PLP-зависимых ферментов в белках структурного типа II млекопитающих с использованием мотива, обнаруженного во взаимодействующем с PdxK бактериальном белке структурного типа II *draL*. **а** — Общий мотив белков структурного типа II млекопитающих, показанный синим, соответствует фиолетовому мотиву в белке *draL*, показанном на рис. 1. В явном виде показаны остатки, выровненные с консервативным аспаратом в мотиве PLP-зависимых ферментов структурного типа I. PLP в активном центре показан зеленым, гем в CBS (HEM) показан голубым. Увеличенное изображение мотива в мономерах (слева) сопровождается визуализацией мотива в димерах ферментов (справа). Используются следующие структуры PDB: серинрацемемаза (SRR) — 6ZSP; сериндегидратаза-подобный белок (SDSL) — 2RKB; цистатионин-β-синтаза (CBS) — 4COO. **б** — Последовательности, соответствующие мотиву белка *draL*, полученные после структурного выравнивания PLP-зависимых ферментов структурного типа II, и логотип мотива. Для получения логотипа в качестве известного PLP-зависимого фермента структурного типа II человека использована и L-сериндегидратаза/L-треониндезаминаза (61% идентичности с SDSL), для которой не получена кристаллическая структура. Последовательность L-сериндегидратазы/L-треониндезаминазы добавлена с использованием множественного выравнивания последовательностей Clustal Omega с гомологичными белками структурного типа II. Остатки мотива PLP-зависимых ферментов структурного типа II, выровненные с консервативным остатком аспартата в мотиве PLP-зависимых ферментов структурного типа I и в белке *draL* типа II, выделены жирным шрифтом и отмечены стрелкой на логотипе мотива. Используемые на рисунке идентификаторы Uniprot: P40817 — *draL*; Q9GZT4 — SRR; Q96GA7 — SDSL; P35520 — CBS; P20132 — L-сериндегидратаза/L-треониндезаминаза

На следующем этапе исследования были разработаны процедуры для идентификации мотива в PLP-зависимых ферментах структурного типа I и II, физическое взаимодействие которых с продуцентами PLP неизвестно. Как упоминалось выше, во всех ферментах структурного типа I этот мотив был идентифицирован ранее как общий структурный элемент, соседствующий с PLP-связывающим остатком

аспартата активного центра [36]. Добавление последовательностей ферментов структурного типа I тирозинтрансминазы (P17735) и кинуренинтрансминазы 1 (Q16773) к последовательностям 10 известных партнеров PdxK и PNPO, показанным в таблице, с последующим повторным поиском локального сходства с помощью GLAM2 позволяет не только обнаружить мотив в целевых белках, для которых

взаимодействие с донорами PLP экспериментально не установлено, но и улучшить параметры результатов поиска GLAM2 (дополнительный рис. S2 в Приложении).

Выявление общего мотива партнеров PdxK среди ферментов структурного типа II является более сложной задачей, поскольку взаимодействующая с PdxK бактериальная *draL* не имеет ортологов у млекопитающих. Поэтому для идентификации общего мотива, найденного в диаминопропионат-аммиак-лиаза, были выбраны известные человеческие PLP-зависимые ферменты структурного типа II, такие как серинрацемемаза (SRR, Q9GZT4), сериндегидратаза-подобный белок (SDSL, Q96GA7) и цистатионин- β -синтаза (CBS, P35520) (рис. 2). Их последовательности были добавлены к тем, что показаны на рис. 1, по отдельности или все вместе. Запуск GLAM2 для этих наборов последовательностей снижает качество результатов. Более того, такой поиск не позволяет надежно идентифицировать мотив с характерной вторичной структурой. Плохой результат GLAM2 может быть связан с тем, что белки структурного типа II могут иметь очень разные последовательности. Например, последовательность CBS имеет удлинение, соответствующее связывающему гем участку, которое отсутствует у других ферментов структурного типа II (рис. 2, *a*). Проблема решается с помощью структурного выравнивания белка *draL* и ферментов структурного типа II человека. Применение этого подхода позволяет идентифицировать общий структурный мотив у бактериального белка *draL* и белков структурного типа II млекопитающих: SRR, SDSL и CBS (рис. 2, *a*). Примечательно, что и в ферментах структурного типа II С-конец общего мотива находится вблизи PLP (рис. 2, *a*), аналогично белкам структурного типа I, где консервативный остаток аспартата на С-конце мотива взаимодействует с атомом азота PLP (рис. 1). В SRR и N-концевая часть мотива является частью активного центра. Так, аминокислотные остатки в начале (R135) и конце (петля H152-P153-N154) структурного мотива SRR, общего для PLP-зависимых ферментов структурных типов I и II, участвуют в связывании субстрата SRR и стабилизации PLP-имина соответственно [37]. Участие концевых частей общего мотива в формировании активного центра подтверждает роль мотива в доставке PLP к активным центрам акцепторов от доноров кофермента.

Возможность существования у акцепторов PLP специфического мотива для связывания PNPO была изучена с использова-

нием доступных данных о трех партнерах PNPO (таблица). Из-за малого количества белков-партнеров параметры достоверности найденного мотива были ожидаемо низкими. Более того, найденный таким образом мотив не сохранялся при добавлении в поиск последовательностей гомологичных ферментов, таких как серингидроксиметилтрансфераза человека, аспартаминотрансфераза *Bacillus* sp. и L-треонинальдолаза из *Pseudomonas* sp. Наконец, обнаруженные таким образом мотивы не имеют единой вторичной структуры, несмотря на принадлежность анализируемых белков одному и тому же структурному типу I. Таким образом, количество известных PLP-зависимых партнеров PNPO (таблица) недостаточно для надежной идентификации специфического для PNPO интерфейса взаимодействия. То же самое относится и к поиску мотива партнеров PLPBP, для которого известны лишь два партнера.

Патогенные мутации в тирозинаминотрансферазе (тип I) и цистатионин- β -синтазе (тип II) внутри или вблизи найденного общего мотива указывают на его функциональную значимость. Согласно гипотезе прямого переноса PLP от белков-доноров к акцепторам, общий мотив PLP-зависимых ферментов может участвовать в таком переносе, формируя интерфейс для гетерологического взаимодействия. В этом случае точечные мутации внутри мотива или поблизости от него должны быть патогенными, несмотря на их локализацию вне активного центра. Скрининг человеческих вариантов на патогенность таких мутаций был проведен для TAT (тип I) и CBS (тип II). Как было показано во введении, эти ферменты вовлечены в злокачественную трансформацию клеток.

Из 20 точечных мутаций TAT, вызывающих синдром Рихнера–Хэнхарта (тирозинемия II типа) [38–44], три находятся в пределах мотива (A237P) или близки к нему (L201R, L273P) (рис. 3, *a*). Повышенный уровень тирозина в плазме крови и болезненные гиперкератотические бляшки возникают у пациентов с мутациями L201R и L273P TAT, локализованными в пределах 5 Å от мотива в альфа-спирали и бета-листе соответственно. Введение положительного заряда (L201R) или нарушение вторичной структуры интерфейса, показанное на рис. 3, *a* фиолетовым цветом, при замене остатка лейцина бета-листа на пролин (L273P) может мешать правильному межбелковому взаимодействию. В случае мутации TAT A237P [41] повышенный уровень тирозина сопровождается не поражением кожи, а умеренными психическими расстройствами.

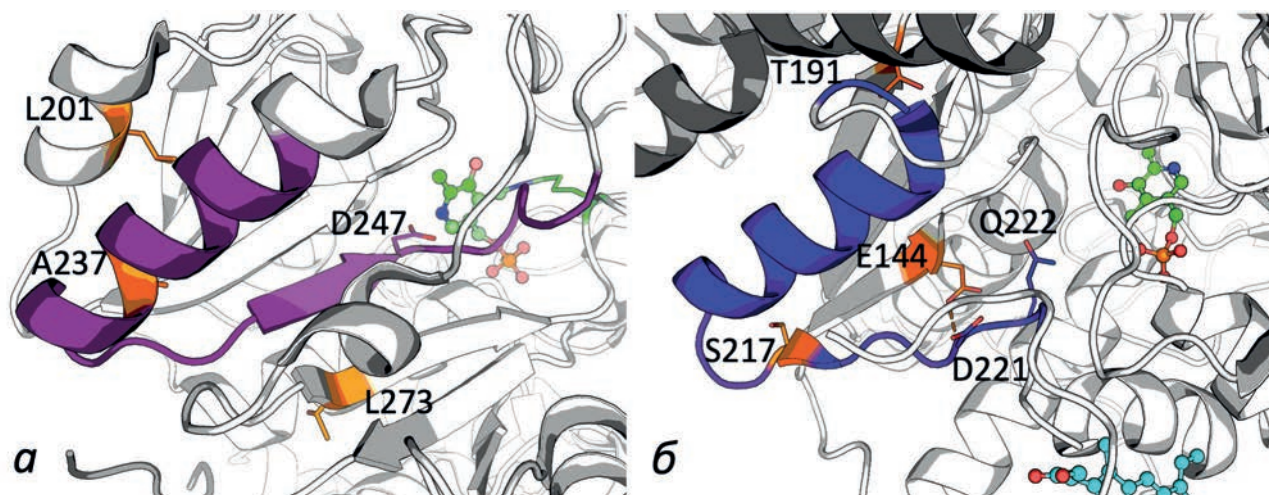


Рис. 3. Патогенные мутации TAT и CBS внутри или рядом с общим мотивом PLP-зависимых белков. *а* – Мутации TAT внутри альфа-спирали мотива (A237P) и в пределах 5 Å от мотива (L201R и L273P). *б* – Мутации CBS внутри бета-тяжа мотива (S217F) и вблизи него (T191M – в 3,5 Å от мотива и E144K – в 2,9 Å от мотива). В нативной CBS E144 образует водородную связь с N-атомом D221 мотива, предшествующего остатку Q222 вблизи центра связывания PLP

Таким образом, структурное нарушение альфа-спирали мотива у мутанта A237P более критично для физиологии, чем косвенные эффекты мутаций L201R и L273P вблизи мотива. Тот факт, что все три мутации сильно влияют на катализ, но расположены близко к поверхности белка и далеко от активного центра, хорошо согласуется с предполагаемой функциональной ролью идентифицированного мотива в качестве интерфейса для переноса PLP.

Из более чем 130 точечных мутаций CBS [22, 45–48] одна (S217F) находится в поверхностной части общего мотива PLP-зависимых ферментов (рис. 3, б). Несмотря на локализацию вне активного центра, эта мутация приводит к 25-кратному снижению активности CBS по сравнению с диким типом и гомоцистинурией [48]. Существенная роль остатка S217 в функционировании CBS хорошо согласуется с его участием в формировании белкового комплекса для доставки PLP от его доноров в активный центр CBS. Другими патогенными мутациями CBS вблизи мотива и за пределами активного сайта являются T191M и E144K (рис. 3, б). Их патогенность можно также объяснить нарушением предполагаемого гетерологического взаимодействия с донорами PLP и/или процесса переноса PLP. В случае мутации T191M это может быть связано с более объемным и более гидрофобным остатком метионина по сравнению с остатком тирозина в нативной CBS. Мутация T191M, широко распространенная в Испании, Португалии и Южной Америке, характеризуется разнообразными фенотипическими симптомами, поражающими скелет, глаза и ЦНС [46]. При-

мечательно, что пациенты с заменой T191M не реагируют на терапию витамином B6. Такая невосприимчивость ожидаема для мутаций, нарушающих не биосинтез PLP, а его доставку от доноров к акцепторам посредством гетерологических белок-белковых взаимодействий, в которых предполагается участие идентифицированного общего мотива. Мутация E144K CBS изменяет заряд на коротком расстоянии от петли мотива, содержащей несколько заряженных остатков (рис. 3, в), что может нарушать ионные взаимодействия, потенциально участвующие в переносе PLP. Интересно, что у пациентов с E144K CBS наблюдается положительный ответ на введение B6. Вероятно, повышенная продукция PLP при большем насыщении продуцентов PLP их субстратом может стимулировать PLP-зависимую модификацию остатка K144 в комплексе мутантной CBS с продуцентами PLP, приводя к частичной компенсации вызываемых мутацией электростатических эффектов, нарушающих перенос. Восстановление нарушенного переноса PLP в модифицированной таким образом мутантной CBS может объяснить терапевтический эффект введения B6 у этого мутанта, отсутствующий у мутанта T191M. Другие механизмы терапевтического действия B6 при мутациях, нарушающих гетерологические взаимодействия, могут быть основаны на аллостерической регуляции продуцентов PLP их субстратами и продуктами [18, 49], поскольку такая регуляция белков-доноров может усиливать нарушенные мутациями гетерологические взаимодействия с акцепторами PLP.

В отличие от партнеров PdxK и PNPO, представленных наиболее многочисленными структурными типами I и II, третий донор PLP млекопитающих, PLPBP, взаимодействует с PLP-зависимыми белками редких структурных типов V (гликогенфосфорилаза) и III (ауто-олигомеризация) (таблица, рис. 4). Структурные типы VI и VII, характерные для очень небольшого числа акцепторов PLP [1] и потому отсутствующие в исходной классификации PLP-зависимых ферментов [21], имеют ту же структуру альфа-бета-бочонка, что и тип III. Отсюда можно предположить, что эти акцепторы PLP также получают PLP от PLPBP, как показано на рис. 4 пунктирными стрелками. Таким образом, в отличие от PdxK и PNPO, передающих PLP белкам наиболее распространенных структурных типов I и II, PLPBP может быть нужен для передачи кофермента акцепторам PLP редких структурных типов, таких как типы III–VII (рис. 4).

Недавнее исследование партнеров PLPBP показало, что среди них преобладают белки, участвующие в организации цитоскелета и клеточном делении, а не PLP-зависимые ферменты [34]. Поэтому основная функция PLPBP не обязательно включает доставку PLP к апоферментам. Участие PLP в организации цитоскелета и клеточных делений подтверждается и связью с этими процессами фосфатазы PLP, известной как хронофин. Помимо гидролиза PLP до PL, хронофин является фосфатазой кофилина [55] — ключевого регулятора контролируемой фосфорилированием динамики актинового цитоскелета. Ассоциация как PLPBP, так и PLP фосфатазы с организацией цитоскелета и делением клеток [34, 55] предполагает недооцененную в настоящее время роль витамина B6 в этих процессах.

Таким образом, мы идентифицировали общий для большинства PLP-зависимых ферментов мотив, простирающийся от белковой поверхности до сайтов связывания PLP. Конформационная динамика мотива при связывании доноров PLP может обеспечить образование канала для обмена PLP. Например, участвующая в переносе PLP открытая конформация активного центра глутаматдекарбоксилазы [19] может стабилизироваться белок-белковыми взаимодействиями с донором PLP. Структурно сходный в очень разных белках, использующих PLP, мотив может быть интерфейсом для присоединения множества белков-акцепторов PLP к ограниченному числу PLP-доноров. Конформационные изменения в гетерологическом комплексе могут сближать активные центры белков-доноров и акцеп-

торов PLP, способствуя межбелковому переносу кофермента. Патогенность человеческих мутаций вне активного сайта, но внутри или рядом с идентифицированным мотивом свидетельствует в пользу такой функции мотива. Поскольку компоненты белковых комплексов, связанных с базовыми функциями клеток, обычно коэкспрессируются [56], об образовании белковых комплексов может косвенно свидетельствовать сопряженная экспрессия продуцентов и PLP-зависимых белков. Действительно, в гепатоцеллюлярной карциноме, для которой характерно снижение функций PLP-зависимых ферментов структурного типа I (TAT) и структурного типа II (CBS) [4, 57], подавляется и продуцент PLP PNPO [58].

Хотя идентифицированный общий мотив разных ферментов-акцепторов PLP обладает сходной структурой и консервативными остатками, необходимыми для взаимодействия с донорами PLP, в каждом белке-акцепторе имеются и специфические для него остатки. Это открывает возможности для разработки пептидных препаратов, избирательно блокирующих интерфейс доставки PLP в представляющих терапевтический интерес ферментах, таких как CBS, усиление функции которой при некоторых видах рака связано с плохим прогнозом [5, 6].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Экспериментально установленные белок-белковые взаимодействия и имеющиеся в настоящее время структурные данные позволили идентифицировать общий для множества PLP-зависимых ферментов структурных типов I и II мотив, который может служить интерфейсом между этими ферментами и продуцирующими PLP PdxK или PNPO. Функциональное значение мотива в межбелковом переносе PLP объясняет патогенность мутаций внутри или вблизи мотива вне активного центра. Взаимодействия PLPBP свидетельствуют о его связывании с PLP-зависимыми белками редких структурных типов III–VII.

Вклад авторов. В.А. Алешин провел поиск литературы и исследовательскую работу, проанализировал и графически представил результаты, написал начальный вариант статьи; В.И. Буник руководила исследованием, анализировала результаты, создала концепцию и написала окончательный вариант статьи.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 20-54-7804).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо ис-

следований с участием людей или животных в качестве объектов, не считая общедоступной из баз данных информации.

Дополнительные материалы. Приложение к статье на английском языке опубликовано на сайте издательства Springer (www.springer.com/journal/10541), том 88, вып. 7, 2023.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Percudani, R., and Peracchi, A. (2009) The B6 database: a tool for the description and classification of vitamin B6-dependent enzymatic activities and of the corresponding protein families, *BMC Bioinformatics*, **10**, 273, doi: 10.1186/1471-2105-10-273.
2. Bargiela, D., Cunha, P. P., Veliça, P., Foskolou, I. P., Barbieri, L., Rundqvist, H., and Johnson, R. S. (2022) Vitamin B6 metabolism determines T cell anti-tumor responses, *Front. Immunol.*, **13**, 837669, doi: 10.3389/fimmu.2022.837669.
3. Fu, L., Dong, S.-S., Xie, Y.-W., Tai, L.-S., Chen, L., Kong, K. L., Man, K., Xie, D., Li, Y., Cheng, Y., Tao, Q., and Guan, X.-Y. (2010) Down-regulation of tyrosine aminotransferase at a frequently deleted region 16q22 contributes to the pathogenesis of hepatocellular carcinoma, *Hepatology*, **51**, 1624-1634, doi: 10.1002/hep.23540.
4. Nguyen, T. N., Nguyen, H. Q., and Le, D. H. (2020) Unveiling prognostics biomarkers of tyrosine metabolism reprogramming in liver cancer by cross-platform gene expression analyses, *PLoS One*, **15**, e0229276, doi: 10.1371/journal.pone.0229276.
5. Ascensão, K., and Szabo, C. (2022) Emerging roles of cystathionine β -synthase in various forms of cancer, *Redox Biol.*, **53**, 102331, doi: 10.1016/j.redox.2022.102331.
6. Zhu, H., Blake, S., Chan, K. T., Pearson, R. B., and Kang, J. (2018) Cystathionine β -synthase in physiology and cancer, *BioMed Res. Int.*, **2018**, 3205125, doi: 10.1155/2018/3205125.
7. Van den Eynde, M. D. G., Scheijen, J. L. J. M., Stehouwer, C. D. A., Miyata, T., and Schalkwijk, C. G. (2021) Quantification of the B6 vitamers in human plasma and urine in a study with pyridoxamine as an oral supplement; pyridoxamine as an alternative for pyridoxine, *Clin. Nutr.*, **40**, 4624-4632, doi: 10.1016/j.clnu.2021.05.028.
8. Vasilaki, A. T., McMillan, D. C., Kinsella, J., Duncan, A., O'Reilly, D. S. J., and Talwar, D. (2008) Relation between pyridoxal and pyridoxal phosphate concentrations in plasma, red cells, and white cells in patients with critical illness, *Am. J. Clin. Nutr.*, **88**, 140-146, doi: 10.1093/ajcn/88.1.140.
9. Tremino, L., Forcada-Nadal, A., Contreras, A., and Rubio, V. (2017) Studies on cyanobacterial protein PipY shed light on structure, potential functions, and vitamin B6-dependent epilepsy, *FEBS Lett.*, **591**, 3431-3442, doi: 10.1002/1873-3468.12841.
10. Ramos, R. J., Albersen, M., Vringer, E., Bosma, M., Zwakenberg, S., Zwartkruis, F., Jans, J. J. M., and Verhoeven-Duif, N. M. (2019) Discovery of pyridoxal reductase activity as part of human vitamin B6 metabolism, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.*, **1863**, 1088-1097, doi: 10.1016/j.bbagen.2019.03.019.
11. Wilson, M. P., Plecko, B., Mills, P. B., and Clayton, P. T. (2019) Disorders affecting vitamin B6 metabolism, *J. Inherit. Metab. Disease*, **42**, 629-646, doi: 10.1002/jimd.12060.
12. Zuo, H., Ueland, P. M., Eussen, S. J. P. M., Tell, G. S., Vollset, S. E., Nygård, O., Midttun, Ø., Meyer, K., and Ulvik, A. (2014) Markers of vitamin B6 status and metabolism as predictors of incident cancer: The Hordaland Health Study, *Int. J. Cancer*, **136**, 2932-2939, doi: 10.1002/ijc.29345.
13. Chen, C.-C., Li, B., Millman, S. E., Chen, C., Li, X., Morris, J. P., Mayle, A., Ho, Y.-J., Loizou, E., Liu, H., Qin, W., Shah, H., Violante, S., Cross, J. R., Lowe, S. W., and Zhang, L. (2020) Vitamin B6 addiction in acute myeloid leukemia, *Cancer Cell*, **37**, 71-84.e77, doi: 10.1016/j.ccell.2019.12.002.
14. Galluzzi, L., Vitale, I., Senovilla, L., Olaussen, K. A., Pinna, G., Eisenberg, T., Goubar, A., Martins, I., Michels, J., Kratassiouk, G., Carmona-Gutierrez, D., Scoazec, M., Vacchelli, E., Schlemmer, F., Kepp, O., Shen, S., Tailler, M., Niso-Santano, M., Morselli, E., Criollo, A., et al. (2012) Prognostic impact of Vitamin B6 metabolism in lung cancer, *Cell Rep.*, **2**, 257-269, doi: 10.1016/j.celrep.2012.06.017.
15. Contestabile, R., di Salvo, M. L., Bunik, V., Tramonti, A., and Verni, F. (2020) The multifaceted role of vitamin B6 in cancer: Drosophila as a model system to investigate DNA damage, *Open Biol.*, **10**, 200034, doi: 10.1098/rsob.200034.
16. Tran, J. U., and Brown, B. L. (2022) Structural basis for allostery in PLP-dependent enzymes, *Front. Mol. Biosci.*, **9**, 884281, doi: 10.3389/fmolb.2022.884281.
17. Matsuo, T., and Sadzuka, Y. (2019) *In vitro* anti-cancer activities of B6 vitamers: a Mini-review, *Anticancer Res.*, **39**, 3429-3432, doi: 10.21873/anticancer.13488.

18. Barile, A., Battista, T., Fiorillo, A., di Salvo, M. L., Malatesta, F., Tramonti, A., Ilari, A., and Contestabile, R. (2021) Identification and characterization of the pyridoxal 5'-phosphate allosteric site in *Escherichia coli* pyridoxine 5'-phosphate oxidase, *J. Biol. Chem.*, **296**, 100795, doi: 10.1016/j.jbc.2021.100795.
19. Giardina, G., Montioli, R., Gianni, S., Cellini, B., Paiardini, A., Voltattorni, C. B., and Cutruzzola, F. (2011) Open conformation of human DOPA decarboxylase reveals the mechanism of PLP addition to Group II decarboxylases, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 20514-20519, doi: 10.1073/pnas.1111456108.
20. Cheung, P. Y., Fong, C. C., Ng, K. T., Lam, W. C., Leung, Y. C., Tsang, C. W., Yang, M., and Wong, M. S. (2003) Interaction between pyridoxal kinase and pyridoxal-5-phosphate-dependent enzymes, *J. Biochemistry*, **134**, 731-738, doi: 10.1093/jb/mvg201.
21. Grishin, N. V., Phillips, M. A., and Goldsmith, E. J. (1995) Modeling of the spatial structure of eukaryotic ornithine decarboxylases, *Protein Sci.*, **4**, 1291-1304, doi: 10.1002/pro.5560040705.
22. Poloni, S., Sperb-Ludwig, F., Borsatto, T., Weber Hoss, G., Doriqui, M. J. R., Embirucu, E. K., Boasorte, N., Marques, C., Kim, C. A., Fischinger Moura de Souza, C., Rocha, H., Ribeiro, M., Steiner, C. E., Moreno, C. A., Bernardi, P., Valadares, E., Artigalas, O., Carvalho, G., Wanderley, H. Y. C., Kugele, J., et al. (2018) CBS mutations are good predictors for B6-responsiveness: a study based on the analysis of 35 Brazilian Classical Homocystinuria patients, *Mol. Genet. Genomic Med.*, **6**, 160-170, doi: 10.1002/mgg3.342.
23. Natt, E., Kida, K., Odievre, M., Di Rocco, M., and Scherer, G. (1992) Point mutations in the tyrosine aminotransferase gene in tyrosinemia type II, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 9297-9301, doi: 10.1073/pnas.89.19.9297.
24. Frith, M. C., Saunders, N. F., Kobe, B., and Bailey, T. L. (2008) Discovering sequence motifs with arbitrary insertions and deletions, *PLoS Comput. Biol.*, **4**, e1000071, doi: 10.1371/journal.pcbi.1000071.
25. Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D. J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, *Nucleic Acids Res.*, **25**, 3389-3402, doi: 10.1093/nar/25.17.3389.
26. Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T. J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Soding, J., Thompson, J. D., and Higgins, D. G. (2011) Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega, *Mol. Syst. Biol.*, **7**, 539, doi: 10.1038/msb.2011.75.
27. Oughtred, R., Rust, J., Chang, C., Breitkreutz, B. J., Stark, C., Willems, A., Boucher, L., Leung, G., Kolas, N., Zhang, F., Dolma, S., Coulombe-Huntington, J., Chatr-Aryamontri, A., Dolinski, K., and Tyers, M. (2021) The BioGRID database: a comprehensive biomedical resource of curated protein, genetic, and chemical interactions, *Protein Sci.*, **30**, 187-200, doi: 10.1002/pro.3978.
28. Hermjakob, H., Montecchi-Palazzi, L., Lewington, C., Mudali, S., Kerrien, S., Orchard, S., Vingron, M., Roechert, B., Roepstorff, P., Valencia, A., Margalit, H., Armstrong, J., Bairoch, A., Cesareni, G., Sherman, D., and Apweiler, R. (2004) IntAct: an open source molecular interaction database, *Nucleic Acids Res.*, **32**, D452-455, doi: 10.1093/nar/gkh052.
29. Szklarczyk, D., Gable, A. L., Nastou, K. C., Lyon, D., Kirsch, R., Pyysalo, S., Doncheva, N. T., Legeay, M., Fang, T., Bork, P., Jensen, L. J., and von Mering, C. (2021) The STRING database in 2021: customizable protein-protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets, *Nucleic Acids Res.*, **49**, D605-D612, doi: 10.1093/nar/gkaa1074.
30. Wan, C., Borgeson, B., Phanse, S., Tu, F., Drew, K., Clark, G., Xiong, X., Kagan, O., Kwan, J., Bezginov, A., Chessman, K., Pal, S., Cromar, G., Papoulas, O., Ni, Z., Boutz, D. R., Stoilova, S., Havugimana, P. C., Guo, X., Malt, R. H., et al. (2015) Panorama of ancient metazoan macromolecular complexes, *Nature*, **525**, 339-344, doi: 10.1038/nature14877.
31. Kim, Y. T., Kwok, F., and Churchich, J. E. (1988) Interactions of pyridoxal kinase and aspartate aminotransferase emission anisotropy and compartmentation studies, *J. Biol. Chem.*, **263**, 13712-13717, doi: 10.1016/s0021-9258(18)68299-7.
32. Deka, G., Kalyani, J. N., Jahangir, F. B., Sabharwal, P., Savithri, H. S., and Murthy, M. R. N. (2019) Structural and functional studies on *Salmonella typhimurium* pyridoxal kinase: the first structural evidence for the formation of Schiff base with the substrate, *FEBS J.*, **286**, 3684-3700, doi: 10.1111/febs.14933.
33. Ghatge, M. S., Karve, S. S., David, T. M., Ahmed, M. H., Musayev, F. N., Cunningham, K., Schirch, V., and Safo, M. K. (2016) Inactive mutants of human pyridoxine 5'-phosphate oxidase: a possible role for a noncatalytic pyridoxal 5'-phosphate tight binding site, *FEBS Open Bio*, **6**, 398-408, doi: 10.1002/2211-5463.12042.
34. Fux, A., and Sieber, S. A. (2020) Biochemical and proteomic studies of human pyridoxal 5'-phosphate-binding protein (PLPBP), *ACS Chem. Biol.*, **15**, 254-261, doi: 10.1021/acscchembio.9b00857.
35. Ito, T., Iimori, J., Takayama, S., Moriyama, A., Yamauchi, A., Hemmi, H., and Yoshimura, T. (2013) Conserved pyridoxal protein that regulates ile and val metabolism, *J. Bacteriol.*, **195**, 5439-5449, doi: 10.1128/jb.00593-13.
36. Schneider, G., Käck, H., and Lindqvist, Y. (2000) The manifold of vitamin B6 dependent

- enzymes, *Structure*, **8**, R1-R6, doi: 10.1016/s0969-2126(00)00085-x.
37. Graham, D. L., Beio, M. L., Nelson, D. L., and Berkowitz, D. B. (2019) Human serine racemase: key residues/active site motifs and their relation to enzyme function, *Front. Mol. Biosci.*, **6**, 8, doi: 10.3389/fmolb.2019.00008.
 38. Pasternack, S. M., Betz, R. C., Brandrup, F., Gade, E. F., Clemmensen, O., Lund, A. M., Christensen, E., and Bygum, A. (2009) Identification of two new mutations in the TAT gene in a Danish family with tyrosinaemia type II, *Br. J. Dermatol.*, **160**, 704-706, doi: 10.1111/j.1365-2133.2008.08888.x.
 39. Bouyacoub, Y., Zribi, H., Azzouz, H., Nasrallah, F., Abdelaziz, R. B., Kacem, M., Rekaya, B., Messaoud, O., Romdhane, L., Charfeddine, C., Bouziri, M., Bouziri, S., Tebib, N., Mokni, M., Kaabachi, N., Boubaker, S., and Abdelhak, S. (2013) Novel and recurrent mutations in the TAT gene in Tunisian families affected with Richner-Hanhart syndrome, *Gene*, **529**, 45-49, doi: 10.1016/j.gene.2013.07.066.
 40. Gokay, S., Kendirci, M., Ustkoyuncu, P. S., Kardas, F., Bayram, A. K., Per, H., and Poyrazoğlu, H. G. (2016) Tyrosinemia type II: Novel mutations in TAT in a boy with unusual presentation, *Pediatrics Int.*, **58**, 1069-1072, doi: 10.1111/ped.13062.
 41. Peña-Quintana, L., Scherer, G., Curbelo-Estévez, M. L., Jiménez-Acosta, F., Hartmann, B., La Roche, F., Meavilla-Olivas, S., Pérez-Cerdá, C., García-Segarra, N., Giguère, Y., Huppke, P., Mitchell, G. A., Mönch, E., Trump, D., Vianey-Saban, C., Trimble, E. R., Vitoria-Miñana, I., Reyes-Suárez, D., Ramírez-Lorenzo, T., and Tugores, A. (2017) Tyrosinemia type II: Mutation update, 11 novel mutations and description of 5 independent subjects with a novel founder mutation, *Clin. Genetics*, **92**, 306-317, doi: 10.1111/cge.13003.
 42. Hühn, R., Stoermer, H., Klingele, B., Bausch, E., Fois, A., Farnetani, M., Di Rocco, M., Boué, J., Kirk, J. M., Coleman, R., and Scherer, G. (1998) Novel and recurrent tyrosine aminotransferase gene mutations in tyrosinemia type II, *Hum. Genetics*, **102**, 305-313, doi: 10.1007/s004390050696.
 43. Maydan, G., Andresen, B. S., Madsen, P. P., Zeigler, M., Raas-Rothschild, A., Zlotogorski, A., Gutman, A., and Korman, S. H. (2006) TAT gene mutation analysis in three Palestinian kindreds with oculocutaneous tyrosinaemia type II; characterization of a silent exonic transversion that causes complete missplicing by exon 11 skipping, *J. Inher. Metab. Dis.*, **29**, 620-626, doi: 10.1007/s10545-006-0407-8.
 44. Charfeddine, C., Monastiri, K., Mokni, M., Laadjimi, A., Kaabachi, N., Perin, O., Nilges, M., Kassas, S., Keirallah, M., Guediche, M. N., Kamoun, M. R., Tebib, N., Ben Dridi, M. F., Boubaker, S., Ben Osman, A., and Abdelhak, S. (2006) Clinical and mutational investigations of tyrosinemia type II in Northern Tunisia: identification and structural characterization of two novel TAT mutations, *Mol. Genet. Metab.*, **88**, 184-191, doi: 10.1016/j.ymgme.2006.02.006.
 45. Moat, S. J., Bao, L., Fowler, B., Bonham, J. R., Walter, J. H., and Kraus, J. P. (2004) The molecular basis of cystathionine beta-synthase (CBS) deficiency in UK and US patients with homocystinuria, *Hum. Mutat.*, **23**, 206, doi: 10.1002/humu.9214.
 46. Urreiziti, R., Asteggiano, C., Bermudez, M., Cordoba, A., Szlago, M., Grosso, C., de Kremer, R. D., Vilarinho, L., D'Almeida, V., Martinez-Pardo, M., Pena-Quintana, L., Dalmau, J., Bernal, J., Briceno, I., Couce, M. L., Rodes, M., Vilaseca, M. A., Balcells, S., and Grinberg, D. (2006) The p.T191M mutation of the CBS gene is highly prevalent among homocystinuric patients from Spain, Portugal and South America, *J. Hum. Genet.*, **51**, 305-313, doi: 10.1007/s10038-006-0362-0.
 47. Kraus, J. P. CBS mutation database. URL: <https://cbs.lfl.cuni.cz/>.
 48. Katsushima, F., Oliveriusova, J., Sakamoto, O., Ohura, T., Kondo, Y., Iinuma, K., Kraus, E., Stouracova, R., and Kraus, J. P. (2006) Expression study of mutant cystathionine β -synthase found in Japanese patients with homocystinuria, *Mol. Genet. Metab.*, **87**, 323-328, doi: 10.1016/j.ymgme.2005.09.013.
 49. Barile, A., Nogues, I., di Salvo, M. L., Bunik, V., Contestabile, R., and Tramonti, A. (2020) Molecular characterization of pyridoxine 5'-phosphate oxidase and its pathogenic forms associated with neonatal epileptic encephalopathy, *Sci. Rep.*, **10**, 13621, doi: 10.1038/s41598-020-70598-7.
 50. Musayev, F. N., Di Salvo, M. L., Ko, T.-P., Schirch, V., and Safo, M. K. (2003) Structure and properties of recombinant human pyridoxine 5'-phosphate oxidase, *Protein Sci.*, **12**, 1455-1463, doi: 10.1110/ps.0356203.
 51. Di Salvo, M. L., Mastrangelo, M., Nogués, I., Tolve, M., Paiardini, A., Carducci, C., Mei, D., Montomoli, M., Tramonti, A., Guerrini, R., Contestabile, R., and Leuzzi, V. (2017) Pyridoxine-5'-phosphate oxidase (Pnpo) deficiency: Clinical and biochemical alterations associated with the C.347g > A (P:Arg116Gln) mutation, *Mol. Genet. Metab.*, **122**, 135-142, doi: 10.1016/j.ymgme.2017.08.003.
 52. Kwok, F., and Churchich, J. E. (1979) Brain pyridoxal kinase. Mobility of the Substrate pyridoxal and binding of inhibitors to the nucleotide site, *Eur. J. Biochem.*, **93**, 229-235, doi: 10.1111/j.1432-1033.1979.tb12815.x.
 53. Choi, S. Y., Churchich, D. R., and Churchich, J. E. (1985) Binding of new plp analogs to the catalytic domain of gaba transaminase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **127**, 346-353, doi: 10.1016/s0006-291x(85)80165-0.
 54. Montioli, R., Zamparelli, C., Borri Voltattorni, C., and Cellini, B. (2017) Oligomeric state and thermal

- stability of apo- and holo- human ornithine δ -aminotransferase, *Protein J.*, **36**, 174-185, doi: 10.1007/s10930-017-9710-5.
55. Gohla, A., Birkenfeld, J., and Bokoch, G. M. (2005) Chronophin, a novel HAD-type serine protein phosphatase, regulates cofilin-dependent actin dynamics, *Nat. Cell Biol.*, **7**, 21-29, doi: 10.1038/ncb1201.
 56. Webb, E. C., and Westhead, D. R. (2009) The transcriptional regulation of protein complexes; a cross-species perspective, *Genomics*, **94**, 369-376, doi: 10.1016/j.ygeno.2009.08.003.
 57. Kim, J., Hong, S. J., Park, J. H., Park, S. Y., Kim, S. W., Cho, E. Y., Do, I. G., Joh, J. W., and Kim, D. S. (2009) Expression of cystathionine beta-synthase is downregulated in hepatocellular carcinoma and associated with poor prognosis, *Oncol. Rep.*, **21**, 1449-1454, doi: 10.3892/or_00000373.
 58. Mei, M., Liu, D., Tang, X., You, Y., Peng, B., He, X., and Huang, J. (2022) Vitamin B6 metabolic pathway is involved in the pathogenesis of liver diseases via Multi-Omics analysis, *J. Hepatocell Carcinoma*, **9**, 729-750, doi: 10.2147/JHC.S370255.

PROTEIN–PROTEIN INTERFACES AS DRUGGABLE TARGETS: A COMMON MOTIF OF THE PYRIDOXAL-5'-PHOSPHATE-DEPENDENT ENZYMES TO RECEIVE THE COENZYME FROM ITS PRODUCERS

V. A. Aleshin^{1,2} and V. I. Bunik^{1,2,3*}

¹ Department of Biokinetics, A. N. Belozersky Institute of Physicochemical Biology,
Lomonosov Moscow State University,
119234 Moscow, Russia; e-mail: aleshin_vasily@mail.ru; bunik@belozersky.msu.ru

² Department of Biochemistry, Sechenov University, 119048 Moscow, Russia

³ Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, Lomonosov Moscow State University, 119234 Moscow, Russia

Pyridoxal-5'-phosphate (PLP), a phosphorylated form of vitamin B6, acts as a coenzyme for numerous reactions, including those changed in cancer and/or associated with the disease prognosis. Since highly reactive PLP may modify cellular proteins, it is hypothesized to be directly transferred from its donors to acceptors. Our goal is to validate the hypothesis by finding common motif(s) in a multitude of the PLP-dependent enzymes for binding the limited number of the PLP donors, namely pyridoxal kinase (PdxK), pyridox(am)in-5'-phosphate oxidase (PNPO) and the PLP-binding protein (PLPBP). Experimentally confirmed interactions between the PLP donors and acceptors reveal that PdxK and PNPO interact with the PLP acceptors of folds I and II, while PLPBP – with those of folds III and V. Aligning the sequences and 3D structures of the identified interactors of PdxK and PNPO, we have found a common motif in the PLP-dependent enzymes of folds I and II. The motif extends from the enzyme surface to the neighborhood of the PLP binding site, represented by an exposed α -helix, a partially buried β -strand and residual loops. Pathogenicity of mutations in human PLP-dependent enzymes within or in the vicinity of the motif, but outside of the active sites, supports functional significance of the motif that may provide an interface for the direct transfer of PLP from the sites of its synthesis to those of the coenzyme binding. The enzyme-specific amino acid residues of the common motif may be used to develop selective inhibitors blocking PLP delivery to the PLP-dependent enzymes critical for proliferation of malignant cells.

Keywords: CBS, PdxK, PNPO, PLPBP, pyridoxal-5'-phosphate-dependent enzyme, TAT, vitamin B6 metabolism, amino acid metabolism, 1-carbon metabolism

ЭКСПРЕССИЯ, ВНУТРИКЛЕТОЧНАЯ ЛОКАЛИЗАЦИЯ И СОЗРЕВАНИЕ ЦИСТЕИНОВЫХ КАТЕПСИНОВ В ЭМБРИОНАЛЬНОЙ И ОПУХОЛЕВЫХ КУЛЬТУРАХ КЛЕТОК ПОЧКИ

© 2023 А.С. Фролова^{1,2}, Н.К. Тихомирова³, И.И. Киреев³, Е.Ю. Зерний³, А. Пароди²,
К.И. Иванов², А.А. Замятнин мл.^{1,2,3,4*}

¹ Институт молекулярной медицины,
Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), 119991 Москва, Россия

² Научно-технологический университет «Сириус», 354340 Сочи, Россия

³ НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского,
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
119992 Москва, Россия; электронная почта: zamyat@belozersky.msu.ru

⁴ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
факультет биоинженерии и биоинформатики, 119234 Москва, Россия

Поступила в редакцию 24.02.2023

После доработки 24.05.2023

Принята к публикации 24.05.2023

Цистеиновые катепсины играют важную роль при развитии опухолей и метастазировании, а их экспрессия повышена во многих опухолевых клетках. Помимо протеолиза белков внеклеточного матрикса и сигнальных молекул на поверхности клетки, цистеиновые катепсины участвуют в канцерогенезе посредством других механизмов, включающих деградацию транскрипционных факторов и нарушение функционирования сигнальных каскадов в клеточном ядре. На данный момент известна роль ряда катепсинов в определённых типах рака, однако нет исследований всех 11 цистеиновых катепсинов в одной опухоли или опухолевой модели. В настоящей работе мы оценивали и сравнивали экспрессию, локализацию и степень созревания всех 11 цистеиновых катепсинов в эмбриональных клетках почки НЕК293 и клеточных линиях рака почки 769-P и A-498. Нами было показано, что в опухолевых клетках экспрессия катепсинов V, B, Z, L и S повышена в 3–9 раз по сравнению с эмбриональными клетками. Также было установлено, что цистеиновые катепсины детектируются не только в цитоплазме, но и в клеточных ядрах как эмбриональных, так и опухолевых клеток. Так, например, более половины специфического флуоресцентного сигнала от катепсинов Z и K обнаруживалось в ядрах опухолевых клеток, а в случае катепсина F доля этого фермента в клеточном ядре превышала 88%. Более того, было обнаружено, что многие цистеиновые катепсины представлены в виде зрелого фермента именно в опухолевых клетках. В дальнейшем полученные результаты могут быть использованы для разработки новых диагностических систем, а также для дальнейшего изучения цистеиновых катепсинов в качестве потенциальных терапевтических мишеней.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: цистеиновые катепсины, внутриклеточная локализация, экспрессия белков, созревание протеиназ, рак почки.

DOI: 10.31857/S032097252307014X, EDN: FYLWMO

ВВЕДЕНИЕ

Цистеиновые катепсины являются лизосомальными протеиназами и относятся к папаин-подобным ферментам. Группа цистеиновых катепсинов состоит из 11 ферментов: катепсины B, C, F, H, K, L, O, S, V, W и Z (X).

Принятые сокращения: GAPDH – глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа.

* Адресат для корреспонденции.

Они имеют общую доменную структуру, но различаются по молекулярной массе и функциям. Основная роль цистеиновых протеиназ заключается в деградации белков и регуляции клеточных процессов [1]. На основе аминокислотной последовательности продомена катепсины подразделяют на L-, B- и F-подобные катепсины [2].

Катепсины состоят из сигнального N-концевого пептида, продомена и каталитического домена [3]. Катепсины синтезируются в виде

неактивной проформы. В процессе многоступенчатого созревания от проформы отщепляется сигнальный пептид и продомен, и образуется зрелый фермент. В некоторых случаях в процессе созревания катепсины образуют одну или несколько промежуточных форм [4].

Цистеиновые катепсины экспрессируются практически всеми клетками организма. Некоторые из них имеют выраженную экспрессию в определённых органах человеческого тела. Например, в группе иммунных клеток катепсин S крайне распространён в антиген-презентирующих клетках [5], а катепсин W экспрессируется преимущественно NK-клетками и Т-лимфоцитами [6]. Повышенная экспрессия катепсинов наблюдается при опухолях мозга [7–9], раке груди [10–13], колоректальном раке [14, 15], меланоме [16], неходжкинской лимфоме [17], плоскоклеточной карциноме [18], раке лёгких [19], желудка [20], тимоме [21], раке почки [22, 23], щитовидной железы [24, 25], крупногранулярном лимфоцитарном лейкозе [26]. Из литературных данных известно, что у пациентов с почечно-клеточным раком в клетках наблюдается повышенная экспрессия катепсина В в сравнении с окружающими неопухолевыми клетками [27]. Катепсин К используется как диагностический маркер при TFE3/TFEB-реаранжированной почечно-клеточной карциноме и почечной эпителиоидной ангиомиолипоме [23]. Повышенную экспрессию цистеиновых катепсинов в опухолевых клетках часто связывают с плохим прогнозом [7, 28], общей низкой выживаемостью [29] и метастазированием [30].

Цистеиновые катепсины рассматриваются в качестве потенциальных маркеров и мишеней для диагностики и лечения определённых типов рака. К потенциальным маркерам можно отнести катепсин В [27], катепсин Н [14], а также катепсин К [23]. Ингибирование активности катепсина В в клетках гепатоцеллюлярной карциномы приводит к снижению клеточного роста опухоли [31, 32]. Пептиды, полученные на основе субстратов папаин-подобной цистеиновой протеиназы тритикаина-альфа, снижают миграцию опухолевых клеток почек, формирование сфероидов и колоний [22]. Нокаут катепсина Z и В при раке груди приводит к уменьшению метастазирования и размеров опухоли [33].

Несмотря на то что цистеиновые катепсины изначально были описаны как лизосомальные протеиназы, их обнаруживают в ядрах клеток, а также в некоторых других внутриклеточных компартментах [25, 34, 35].

В целом, функциональная роль «ядерных» цистеиновых катепсинов пока малоизучена. Однако показано, что наличие ядерного катепсина L коррелирует с негативным прогнозом выживаемости онкологических пациентов [36].

Многие исследования фокусируются на изучении одного определённого цистеинового катепсина. Несмотря на то что многие катепсины экспрессируются при определённом типе рака, в литературе практически отсутствуют работы, направленные на изучение экспрессии всех цистеиновых катепсинов одновременно. С целью заполнить этот пробел в настоящем исследовании мы изучили уровни экспрессии всех 11 цистеиновых катепсинов в эмбриональных клетках почки человека HEK293 и в опухолевых линиях почки 769-Р и А-498, а также определили локализацию и степень созревания цистеиновых катепсинов, присутствующих в этих клетках.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культивирование клеточных линий. Клеточные линии карциномы почки человека 769-Р, А-498 и человеческие эмбриональные клетки почки HEK293 были получены из американской коллекции типовых культур. Клетки 769-Р и А-498 выращивали на флаконах в среде RPMI-1640, дополненной 10%-ной эмбриональной телячьей сывороткой (v/v) и 1%-ной смесью антибиотиков пенициллин-стрептомицин (v/v) («Gibco», США) при 37 °С в атмосфере 5% CO₂. Клетки HEK293 выращивали на среде DMEM с теми же добавками и в тех же условиях.

Получение антител против катепсина L. Поликлональные антитела против катепсина L были получены и очищены в соответствии с обычной процедурой [37]. Вкратце, очищенный рекомбинантный катепсин L (1 мг/мл) смешивали в соотношении 1 : 1 с 1 мл вспомогательного адъюванта Фрейнда и подкожно вводили кролику. Через месяц иммунизацию усилили путём введения рекомбинантного катепсина L (1 мг/мл), смешанного с неполным адъювантом Фрейнда в том же соотношении. Через две недели после повторной иммунизации собрали кровь, и антитела очистили методом аффинной хроматографии. Для этого 1,2 мг рекомбинантного катепсина L смешали с 0,6 мл CNBr-активированной сефарозы («GE Lifesciences», США), следуя инструкциям производителя. Сыворотку разбавили в 2 раза раствором PBS и загрузили на иммуноаффинную

колонку. Антитела были удалены с колонки 0,2 М глицином (pH 2,5), элюат нейтрализовали 1 М Tris-HCl (pH 9,0). Антитела осадили сухим сульфатом аммония до насыщения 75%. Осадок антител центрифугировали, суспендировали в 50%-ном насыщенном растворе сульфата аммония и хранили при 4 °C.

Фракционирование клеточных структур.

Фракционирование клеточных линий на цитоплазматическую и ядерную фракции проводили по основной методике [38] с некоторыми модификациями. Клетки отмывали от среды охлаждённым PBS. К клеткам добавляли сахарозный буфер (0,32 М сахароза, 3 мМ CaCl₂, 2 мМ ацетат магния, 0,1 мМ ЭДТА, 10 мМ Tris-HCl, 1 мМ ДТТ, 0,5%-ный NP-40 (v/v), коктейль ингибиторов протеиназ («Sigma-Aldrich», США)), собирали скребком с клеточного пластика и переносили в пробирку во льду. Через 30 мин инкубации во льду с периодическим пипетированием образцы центрифугировали в течение 15 мин при 3000 g, +4 °C. После центрифугирования отбирали супернатант, содержащий цитоплазматическую фракцию, и ресуспендировали ядерный осадок в сахарозном буфере без добавления NP-40. После центрифугирования при 3000 g, +4 °C в течение 5 мин ядра ресуспендировали сначала в низкосолеовом буфере (20 мМ HEPES, pH 7,9, 20%-ный глицерин (v/v), 1,5 мМ MgCl₂, 0,02 М KCl, 0,2 мМ ЭДТА, 0,5 мМ ДТТ, коктейль ингибиторов протеиназ («Sigma-Aldrich»)), потом в высокосолеовом буфере (20 мМ HEPES, pH 7,9, 20%-ный глицерин (v/v), 1,5 мМ MgCl₂, 0,8 М KCl, 0,2 мМ ЭДТА, 1%-ный NP-40 (v/v), 0,5 мМ ДТТ, коктейль ингибиторов протеиназ («Sigma-Aldrich»)). Ядра инкубировали в течение 30 мин во льду и центрифугировали на 16 000 g в течение 15 мин при +4 °C. Отобранный супернатант содержал ядерную фракцию. Цитоплазматическую и ядерную фракции хранили при -80 °C. Фракции смешивали с 2× буфером для нанесения образцов (125 мМ Tris-HCl, pH 6,8, 20%-ный глицерин (v/v), 4%-ный SDS (w/v), 0,004%-ный бромфеноловый синий (w/v), 10%-ный 2-меркаптоэтанол (v/v)) и прогревали в течение 5 мин при 96 °C. На ПААГ наносили по 6 мкг цитоплазматической фракции и 60 мкг ядерной фракции.

Получение образцов клеточных лизатов.

Клетки аккуратно промывали охлаждённым PBS и лизировали в RIPA-буфере (150 мМ NaCl, 50 мМ Tris-HCl, pH 8,0, 1%-ный NP-40 (v/v), 0,5%-ный дезоксихолат натрия (w/v), 0,1%-ный SDS (w/v)) с добавлением коктейля ингибиторов протеиназ («Sigma-Aldrich»)

в течение 30 мин во льду. Клеточный лизат центрифугировали на 16 000 g при температуре +4 °C в течение 15 мин. Полученный клеточный лизат смешивали с 2× буфером для нанесения образцов (125 мМ Tris-HCl, pH 6,8, 20%-ный глицерин (v/v), 4%-ный SDS (w/v), 0,004%-ный бромфеноловый синий (w/v), 10%-ный 2-меркаптоэтанол (v/v)) и прогревали в течение 5 мин при 96 °C. На ПААГ наносили по 30 мкг клеточного лизата.

Вестерн-блот. Готовые образцы разделяли в 14%-ном ПААГ и переносили на PVDF-мембрану («Merck Millipore», США). В работе использовали антитела к катепсинам V, C, B, K, W, Z, O, H, S («Abcam», Великобритания), катепсину L, катепсину F, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназе (GAPDH), ламинам A/C («Thermo Fisher Scientific», США), а также вторичные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена («Thermo Fisher Scientific»). Мембраны проявляли набором Clarity Western ECL Substrate («Bio-Rad», США). Денситометрический анализ проводили в программе GelAnalyzer 19.1. Полученные данные нормировали к контролю нагрузки GAPDH и представляли в относительных единицах. Проверку чистоты цитоплазматической и ядерной фракций проводили по цитоплазматическому белку GAPDH и ядерным белкам ламинам A/C.

Флуоресцентная микроскопия. Клетки отмывали в охлаждённом PBS, фиксировали в 4%-ном PFA (w/v)/PBS в течение 10 мин и пермеабелизовали в 0,25%-ном Triton X-100 (v/v) в течение 10 мин. Для блокировки неспецифических сайтов связывания клетки блокировали в 1%-ном BSA (w/v)/1× PBS-T/100 мМ глицине в течение 30 мин. Далее клетки инкубировали с первичными антителами, описанными в разделе «Вестерн-блот», 1 ч при комнатной температуре. После этого к клеткам добавили меченные флуорофором вторичные антитела («Thermo Fisher Scientific») на 1 ч. Ядра клеток окрашивали ядерным красителем DAPI («Thermo Fisher Scientific») и заключали в монтирующую среду («Sigma-Aldrich»). Клетки визуализировали на конфокальном микроскопе C2 на платформе Eclipse Ti-E («Nikon», Япония). Анализ флуоресцентных изображений проводили в программе ImageJ 1.53c.

Анализ результатов. Статистический анализ результатов был выполнен с использованием программы GraphPad Prism 8.4.3. Результаты сравнительного анализа экспрессии представлены как среднее значение ± стандартное отклонение.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Экспрессия цистеиновых катепсинов различается в эмбриональных и опухолевых клетках почки. Для определения уровня экспрессии цистеиновых катепсинов в эмбриональных и опухолевых клетках почки был проведён вестерн-блоттинг клеточных лизатов (рис. 1). Результаты анализа показали, что все 11 цистеиновых катепсинов обнаруживаются как в эмбриональных клетках почки НЕК293, так и в двух опухолевых линиях клеток почки, 769-Р и А-498. Однако между эмбриональной и опухолевыми линиями были выявлены значимые различия в уровне экспрессии, а также в наличии различных форм цистеиновых катепсинов, отражающих степени созревания ферментов. Выяснилось, что опухолевые клетки почки продуцируют в среднем больше катепсина V (в 9,34 раз), катепсина Z (в 5,5), катепсина L (в 3,34), катепсина S (в 9,2) и катепсина B (в 3,34) в сравнении с эмбриональными клетками почки. Примечательно, что, помимо увеличенной экспрессии катепсинов L и B, в опухолевых клетках также детектировалось большее количество зрелых форм этих белков.

В опухолевых клетках уровень содержания проформы и промежуточной формы катепсина C был выше, чем в эмбриональных клетках, в то время как уровень содержания зрелой формы катепсина C снижался. Количество проформы и промежуточной формы катепсина O, наоборот, оказалось снижено в опухолевых клетках по сравнению с содержанием катепсина O в эмбриональных клетках, а зрелый катепсин O с молекулярной массой около 20 кДа детектировался исключительно в опухолевых клетках. В опухолевых клетках почки катепсин K присутствовал преимущественно в зрелой форме, а в эмбриональных клетках, наоборот, было больше проформы катепсина K. Количественное содержание проформы и промежуточной формы катепсина H различалось во всех трёх клеточных линиях. Однако зрелая форма катепсина H в опухолевых клетках была представлена в меньшем количестве, чем в эмбриональных клетках.

Экспрессия всех F-подобных катепсинов (катепсина F и W) оказалась выше в эмбриональных клетках почки по сравнению с экспрессией в опухолевых клетках. Помимо выявленных изменений в уровнях экспрессии катепсинов в эмбриональных и опухолевых клетках следует отдельно отметить, что в опухолевых клетках дополнительно детектировались промежуточные формы катепсинов V, K, C и H.

Таким образом, исходя из полученных результатов, можно заключить, что все 11 цистеиновых катепсинов продуцируются как эмбриональными, так и опухолевыми клетками, однако уровень их экспрессии, а также набор форм, характерных для разных этапов созревания ферментов, могут существенно различаться. При этом опухолевые клетки почки содержат достоверно большее количество катепсинов V, B, Z, L и S по сравнению с эмбриональными клетками почки.

Цистеиновые катепсины присутствуют в ядрах и в цитоплазме эмбриональных и опухолевых клеток почки, но в разных соотношениях. На следующем этапе исследования изучалась внутриклеточная локализация цистеиновых катепсинов в эмбриональных и опухолевых клетках почки. Цистеиновые катепсины, окрашенные с помощью антител, конъюгированных с флуоресцентным красителем, визуализировали с помощью конфокальной микроскопии (рис. 2). Ядра клеток окрашивали ядерным красителем DAPI.

Результаты микроскопии показали, что все цистеиновые катепсины детектировались как в цитоплазме, так и в ядрах эмбриональных и опухолевых клеток почки. Тем не менее распределение конкретных белков между цитоплазмой и ядром существенно различалось. Например, около 90% сигнала катепсина F приходилось на ядра эмбриональных и опухолевых клеток. Исходя из распределения флуоресцентных сигналов в клетках, был сделан вывод о том, что большая часть катепсинов Z, B, O, K и H (более 50% от всего сигнала) содержится в ядрах клеток 769-Р, в то время как в ядрах клеток А-498 представлено больше катепсина Z и K.

Сигнал от некоторых цистеиновых катепсинов в цитоплазме и ядре различался между эмбриональными и опухолевыми клетками почки. В эмбриональных клетках 49% сигнала от катепсина V и 65,15% сигнала от катепсина W детектировалось в ядрах клеток, в то время как в опухолевых клетках происходило снижение сигнала до 22,94% и 24,76% для катепсина V и до 16% и 16,46% для катепсина W в ядрах клеток 769-Р и А-498 соответственно.

Проанализировав распределение катепсинов B, O и Z в эмбриональных и опухолевых клетках, мы обнаружили статистические различия только в одной из клеточных линий в сравнении с эмбриональными клетками. Так, в ядрах опухолевых клеток 769-Р уровень катепсина Z был снижен с 73,35% до 50,1%, а в опухолевых клетках А-487 достоверно снижалась ядерная локализация катепсина B с 55,68% до 21,65% и катепсина O с 66,92% до 39,88%.

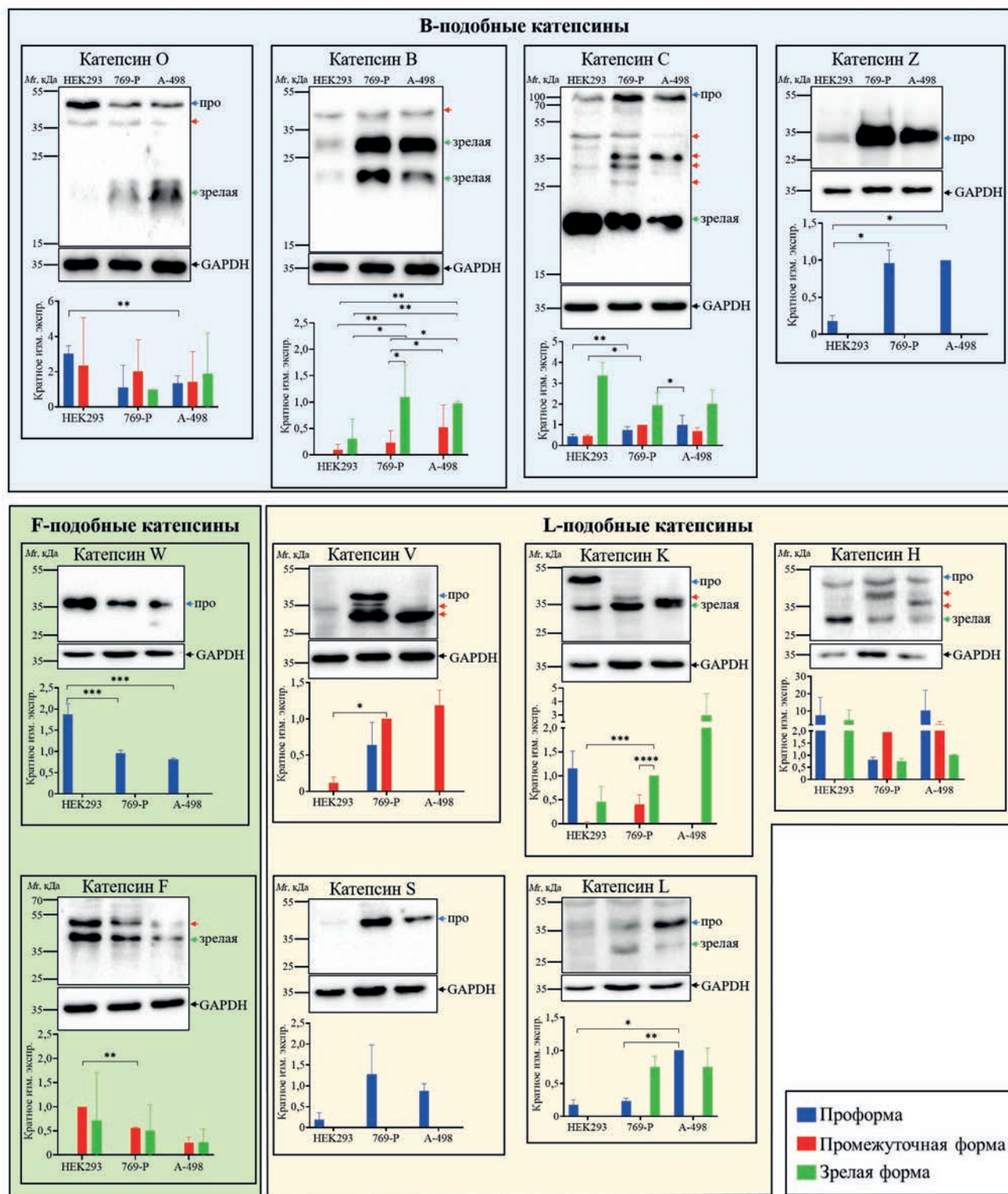


Рис. 1. Экспрессия В-, F- и L-подобных цистеиновых катепсинов в эмбриональных клетках почки HEK293 и опухолевых клетках почки 769-P и A-498. Анализ клеточных лизатов проводился с помощью вестерн-блоттинга. Мембраны окрашивались с помощью антител против 11 цистеиновых катепсинов, а также против GAPDH с целью количественного контроля нанесения образцов. Про – проформа катепсина, зрелая – зрелая форма катепсина, стрелки без подписей – промежуточные формы катепсинов. Гистограммы представляют результаты подсчёта вестерн-блотов (среднее значение и среднее квадратичное отклонение). Кратное изменение экспрессии вычислено как отношение значения интенсивности сигнала полосы белка к медианному значению интенсивности сигнала полосы белка. Медиана была выбрана среди значений интенсивностей сигналов полос белков, которые представлены на рисунке для определённого катепсина. Все значения интенсивностей сигналов полос белков были нормализованы по GAPDH. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$

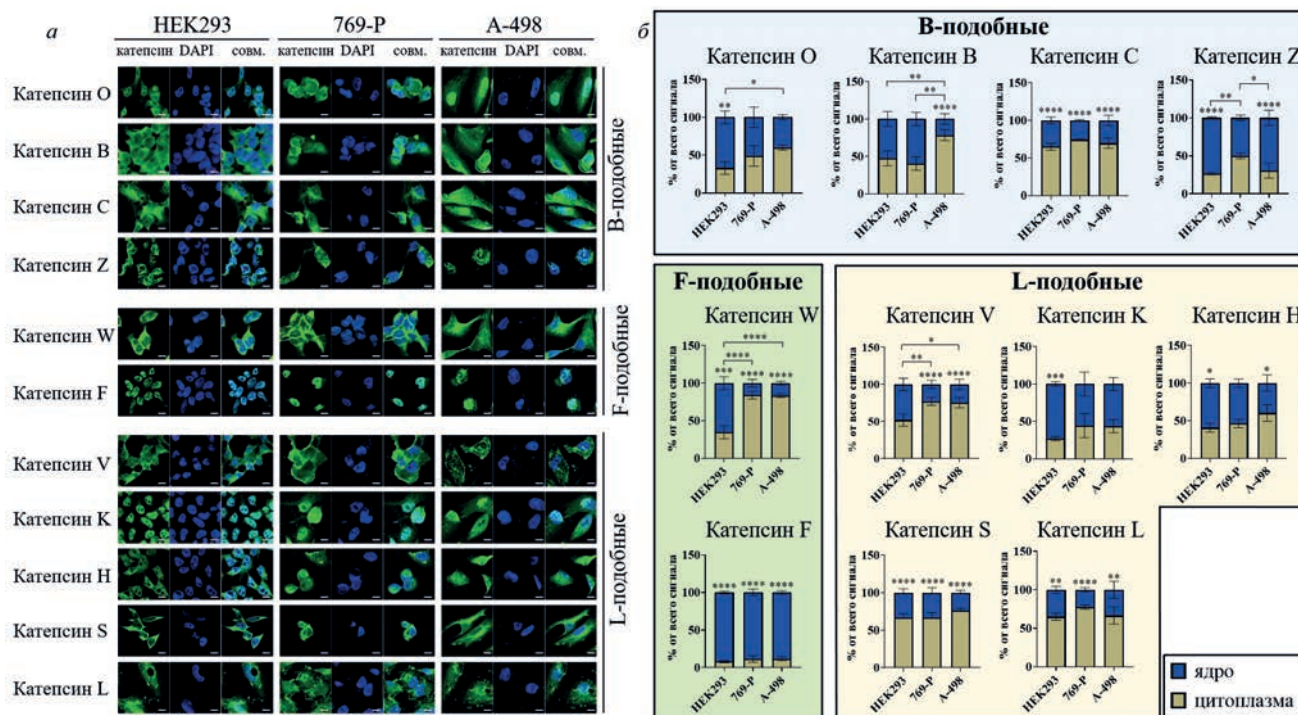


Рис. 2. Внутриклеточная локализация В-, F- и L-подобных цистеиновых катепсинов в эмбриональных клетках почки HEK293 и опухолевых клетках почки 769-P и A-498. *а* — Микрофотографии, полученные с помощью конфокальной микроскопии. Окрашивание проводилось с помощью антител к цистеиновым катепсинам и параллельно с помощью ядерного красителя DAPI. Размер масштабной шкалы — 10 мкм. Совм. — совмещённая фотография. *б* — Результаты подсчёта соотношений флуоресцентных сигналов от конъюгированных антител, детектируемых в цитоплазме или в ядре в клеточных линиях HEK293, 769-P и A-498 (среднее значение и среднее квадратичное отклонение). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$

В то же время флуоресцентные сигналы от катепсинов S, H, K, L и C, детектируемые в цитоплазме и ядрах, в эмбриональных и опухолевых клетках не показали достоверных различий.

Полученные результаты позволяют заключить, что цистеиновые катепсины содержатся в ядрах и цитоплазме как в эмбриональных, так и в опухолевых клетках почки. Однако соотношения содержания отдельных ферментов в ядре и цитоплазме могут достоверно различаться в зависимости от типа клеток.

Цистеиновые катепсины созревают в опухолевых клетках почки эффективнее, чем в эмбриональных клетках почки. Следующий этап исследования заключался в определении различных форм катепсинов, образующихся при созревании ферментов и содержащихся в цитоплазме и ядрах эмбриональных и опухолевых клеток почки. Методом фракционирования клеточных компонентов были получены цитоплазматическая и ядерная фракции, которые анализировали с помощью вестерн-блоттинга с использованием антител ко всем 11 катепсинам (рис. 3).

Анализ с помощью вестерн-блоттинга показал, что катепсины Z, W, V и L содержатся

в клетках в виде проформ: проформа белков определялась в цитоплазме и ядрах клеток (рис. 3). Проформы, а также зрелые формы катепсинов K, C, F и H определялись в ядерных фракциях, полученных из всех трёх клеточных линий. При анализе фракций на наличие катепсина S выявлялась только проформа в ядерной фракции эмбриональных клеток почки. Катепсин O в зрелой активной форме детектировался в ядерной фракции, полученной из опухолевых клеток, в то время как в ядерной фракции эмбриональных клеток определялась исключительно проформа и промежуточная форма. Катепсин В преимущественно определялся в цитоплазматической фракции в виде промежуточной и зрелой формы, в то время как в ядерной фракции содержалось лишь небольшое количество промежуточной формы катепсина В.

Исходя из результатов, представленных выше, можно сделать вывод, что в ядрах клеток цистеиновые катепсины представлены во всех возможных формах. Формы катепсина O и В различаются в ядерной фракции эмбриональных и опухолевых клеток почки. Кроме того, также можно сделать вывод о том, что процессы созревания катепсинов происходят

эффективнее в ядрах и цитоплазме опухолевых клеток, чем в ядрах и цитоплазме эмбриональных клеток.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные в настоящей работе результаты подтверждают и дополняют имеющиеся в литературе данные о том, что экспрессия практически всех цистеиновых катепсинов повышена в опухолевых клетках [7–26]. На молекулярном уровне повышенная экспрессия и секреция цистеиновых катепсинов ведёт к протеолизу белков внеклеточного матрикса и поверхностных мембранных белков, что, в свою очередь, приводит к разрушению межклеточных контактов, миграции раковых клеток и метастазированию опухоли [39].

В настоящей работе мы обнаружили повышенную экспрессию катепсинов В и L в клетках рака почки. В других опухолевых клетках, таких как клетки рака поджелудочной железы, также наблюдается повышенный уровень катепсинов В и L [40, 41]. На мышинной модели канцерогенеза клеток островков поджелудочной железы RIP1-Tag2 было показано участие катепсинов В и L в протеолизе супрессора опухолей Е-кадгерина [42], что ведёт к активации эпителиально-мезенхимального перехода. Это, в свою очередь, приводит к усилению метастазирования и химиорезистентности опухолевых клеток [43]. Мы предполагаем, что в опухолевых клетках почки может происходить аналогичное расщепление Е-кадгерина при помощи катепсинов В и L. Мы также увидели повышенную экспрессию катепсинов Н, К и Z, для которых были определены молекулярные механизмы участия этих ферментов в развитии рака простаты [44, 45] и печени [46]. Более того, результаты, полученные в настоящей работе, согласуются с литературными данными о том, что повышенный уровень катепсинов наблюдается при раке мозга [7–9, 47], груди [10–13], лёгких [19], кишечника [14, 15], кожи [16] и простаты [44, 45, 48, 49].

Интересно, что в опухолевых клетках почки происходит изменение соотношения форм катепсинов К и О в сторону зрелых форм этих ферментов. Зрелая форма катепсина К является каталитически активной и обычно образуется внутри лизосом [1]. Соответственно, преобладание зрелой формы катепсинов К и О в раковых клетках может свидетельствовать о более полном процессинге этих ферментов в лизосомах, ведущему к их полной активации.

Логично предположить, что онкогенная роль катепсинов К и О в развитии рака почки может быть обусловлена их более полной активацией. Гипотеза о том, что эффективное созревание катепсинов К и О обуславливает их активное вовлечение в процесс канцерогенеза, согласуется с недавно опубликованными данными о роли этих катепсинов в развитии рака предстательной железы [45] и груди [11].

Наличие множественных промежуточных форм катепсинов в опухолевых клетках почки можно объяснить каталитической активностью цистеиновых протеиназ. Известно, что катепсины К и V могут расщеплять катепсин С с образованием нескольких промежуточных форм [50]. Молекулярный вес этих промежуточных форм соответствует размерам фрагментов катепсина С, найденных нами в опухолевых клетках почки.

При анализе экспрессии цистеиновых катепсинов мы обнаружили, что экспрессия и формы катепсинов О, С, V, Н и L различаются в опухолевых клетках 769-Р и А-498. Используемые в данной работе опухолевые клеточные линии 769-Р и А-498 принадлежат к группе карцином почки. Некоторые исследователи относят линию А-498 к папиллярной клеточной карциноме почки, в то время как линия 769-Р принадлежит к группе светлоклеточного рака почки. Эти группы имеют разные молекулярные и гистологические характеристики [51, 52]. Так, например, в клеточных линиях 769-Р и А-498 наблюдался разный уровень роста клеток при добавлении растительных экстрактов [53], а также отличалась чувствительность клеток в ответ на TRAIL-индуцированный апоптоз [54]. Исходя из вышеуказанных молекулярных, морфологических и биохимических различий между клеточными линиями 769-Р и А-498, в них можно ожидать разного уровня экспрессии цистеиновых катепсинов и разного соотношения их процессированных форм.

В настоящей работе мы показали, что все 11 цистеиновых катепсинов присутствуют в ядрах как эмбриональных, так и опухолевых клеток почки. Эти результаты подтверждаются литературными данными о ядерной локализации ряда катепсинов в раковых клетках [15, 23, 25, 36, 49–58]. Вместе с тем мы впервые показали, что катепсины О, W, Z и К присутствуют не только в цитоплазме, но и в клеточном ядре.

Обнаруженная в настоящей работе ядерная локализация цистеиновых катепсинов в клетках рака почки подтверждается литературными данными об их канцерогенной роли

в клеточном ядре. Так, например, активная, зрелая форма катеписина L обнаруживается в ядре клеток колоректальной карциномы HCT116, где она участвует в нарушении клеточного цикла [57]. Более того, в этих клетках отсутствует физиологический ингибитор катеписина L — стефин В. Молекулярный механизм канцерогенного действия катеписина L в клеточном ядре связан с протеолизом транскрипционного фактора CDP/Cux, который участвует в регуляции клеточного цикла [59] и может выступать в роли онкогена [60]. Другой пример включает в себя катеписины В, К, L и S, ассоциированные с ядерной мембраной и регулирующие ядерный транспорт белков SMAD, которые являются важными компонентами сигнального пути TGF-β. Этот сигнальный путь играет важную роль как в развитии рака [61], так и в противораковом иммунитете [62]. Ещё один представитель семейства цистеиновых катепсинов, катеписин V, также обнаруживается в ядрах клеток карциномы щитовидной железы. Его укороченная N-терминальная ядерная форма, вероятно, участвует в нарушении клеточного цикла и вызывает гиперпролиферацию [24].

Результаты нашего исследования показывают, что в опухолевых клетках почки зрелые цистеиновые катеписины частично локализуются в ядрах клеток. Из литературных данных известно, что катеписины активируются при кислых значениях pH [63] или при помощи других протеиназ [50]. С другой стороны, повышение pH обычно приводит к потере катеписинами своей активности [64]. Мы предполагаем, что в pH-нейтральной среде клеточного ядра катеписины могут либо частично терять свою активность, либо менять свою субстратную специфичность, что позволяет предотвратить неспецифическую деградацию ядерных белков. Помимо этого, каталитическая активность катепсинов в ядре клетки может регулироваться их селективными ингибиторами стефинами, ядерная локализация которых подтверждается литературными данными [65].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе было проведено сравнение уровней экспрессии цистеиновых катепсинов в эмбриональных и опухолевых клетках почки. Мы определили, что экспрессия цистеиновых катепсинов V, B, Z, F и H повышена в опухолевых клетках. По наличию зрелых форм ферментов можно сделать вывод о том, что процессы созревания происходят более активно в опухолевых клетках по сравнению с эмбриональными. Также была описана локализация для всех 11 цистеиновых катепсинов в одной клеточной модели и обнаружено, что все эти ферменты в разной степени присутствуют в клеточном ядре. Важно, что часть катепсинов была обнаружена в ядре в активной форме, что позволяет предположить, что цистеиновые катеписины являются функционально активными не только в цитоплазме, но и в ядрах клеток. Функции некоторых катепсинов с ядерной локализацией активно изучают, но молекулярные механизмы их действия и субстраты ещё только предстоит выявить. Мы надеемся, что результаты настоящей работы по изучению экспрессии и локализации цистеиновых катепсинов найдут своё применение в будущем, в том числе при поиске опухолевых маркеров в тканях пациентов с раком почки.

Вклад авторов. А.С.Ф., А.А.З. — концепция и руководство работой; А.С.Ф., Н.К.Т., И.И.К. — проведение экспериментов; А.С.Ф., Е.Ю.З., А.П., К.И.И., А.А.З. — обсуждение результатов исследования; А.С.Ф., А.А.З. — написание текста; А.С.Ф., К.И.И., А.А.З. — редактирование текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 21-75-30020).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yadati, T., Houben, T., Bitorina, A., and Shiri-Sverdlov, R. (2020) The ins and outs of cathepsins: physiological function and role in disease management, *Cells*, **9**, 1679, doi: 10.3390/cells9071679.
2. Manchanda, M., Fatima, N., Chauhan, S.S. (2017) Physiological and Pathological Functions of Cysteine Cathepsins. In: *Proteases in Physiology and Pathology*, Springer, Singapore, doi: 10.1007/978-981-10-2513-6_11.
3. Turk, V., Stoka, V., Vasiljeva, O., Renko, M., Sun, T., Turk, B., and Turk, D. (2012) Cysteine cathepsins: from structure, function and regulation to new

- frontiers, *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteomics*, **1824**, 68–88, doi: 10.1016/j.bbapap.2011.10.002.
4. Bestvater, F., Dallner, C., and Spiess, E. (2005) The C-terminal subunit of artificially truncated human cathepsin B mediates its nuclear targeting and contributes to cell viability, *BMC Cell Biol.*, **6**, 16, doi: 10.1186/1471-2121-6-16.
 5. Hsing, L. C., and Rudensky, A. Y. (2005) The lysosomal cysteine proteases in MHC class II antigen presentation, *Immunol. Rev.*, **207**, 229–241, doi: 10.1111/j.0105-2896.2005.00310.x.
 6. Stoeckle, C., Gouttefangeas, C., Hammer, M., Weber, E., Melms, A., and Tolosa, E. (2009) Cathepsin W expressed exclusively in CD8⁺ T cells and NK cells, is secreted during target cell killing but is not essential for cytotoxicity in human CTLs, *Exp. Hematol.*, **37**, 266–275, doi: 10.1016/J.EXPHEM.2008.10.011.
 7. Cheng, X., Ren, Z., Liu, Z., Sun, X., Qian, R., Cao, C., Liu, B., Wang, J., Wang, H., Guo, Y., et al. (2022) Cysteine cathepsin C: a novel potential biomarker for the diagnosis and prognosis of glioma, *Cancer Cell Int.*, **22**, 53, doi: 10.1186/S12935-021-02417-6.
 8. Majc, B., Habič, A., Novak, M., Rotter, A., Porčnik, A., Mlakar, J., Župunski, V., Fonović, U. P., Knez, D., Zidar, N., et al. (2022) Upregulation of cathepsin X in glioblastoma: interplay with γ -enolase and the effects of selective cathepsin X inhibitors, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 1784, doi: 10.3390/ijms23031784.
 9. Verbovšek, U., Motaln, H., Rotter, A., Atai, N. A., Gruden, K., Van Noorden, C. J. F., and Lah, T. T. (2014) Expression analysis of all protease genes reveals cathepsin K to be overexpressed in glioblastoma, *PLoS One*, **9**, e0142116, doi: 10.1371/journal.pone.0111819.
 10. Xiao, Y., Cong, M., Li, J., He, D., Wu, Q., Tian, P., Wang, Y., Yang, S., Liang, C., Liang, Y., et al. (2021) Cathepsin C promotes breast cancer lung metastasis by modulating neutrophil infiltration and neutrophil extracellular Trap formation, *Cancer Cell*, **39**, 423–437, doi: 10.1016/J.CCELL.2020.12.012.
 11. Cairns, J., Ingle, J. N., Wickerham, L. D., Weinshilboum, R., Liu, M., and Wang, L. (2017) SNPs near the cysteine proteinase cathepsin O gene (CTSO) determine tamoxifen sensitivity in ER α -positive breast cancer through regulation of BRCA1, *PLoS Genet.*, **13**, e1007031, doi: 10.1371/JOURNAL.PGEN.1007031.
 12. Santamaría, I., Velasco, G., Cazorla, M., Fueyo, A., Campo, E., and López-Otín, C. (1998) Cathepsin L2, a novel human cysteine proteinase produced by breast and colorectal carcinomas, *Cancer Res.*, **58**, 1624–1630.
 13. Sereesongsang, N., McDowell, S. H., Burrows, J. F., Scott, C. J., and Burden, R. E. (2020) Cathepsin V suppresses GATA3 protein expression in luminal A breast cancer, *Breast Cancer Res.*, **22**, 139, doi: 10.1186/S13058-020-01376-6.
 14. Schweiger, A., Christensen, I. J., Nielsen, H. J., Sørensen, S., Brünner, N., and Kos, J. (2018) Serum cathepsin H as a potential prognostic marker in patients with colorectal cancer, *Int. J. Biol. Markers*, **19**, 289–294, doi: 10.1177/172460080401900406.
 15. Tamhane, T., Njenga, R. W., Burden, R. E., Büth, H., Maeldansmo, G. M., Haugen, M. H., Scott, C. J., and Brix, K. (2021) Trafficking of full-length and N-terminally truncated cathepsin B in human colorectal carcinoma cells, *Appl. Sci.*, **11**, 11936, doi: 10.3390/app112411936.
 16. Kos, J., Stabuc, B., Schweiger, A., Krasovec, M., Cimerman, N., Kopitar-Jerala, N., and Vrhovec, I. (1997) Cathepsins B, H, and L and their inhibitors stefin A and cystatin C in sera of melanoma patients, *Clin Cancer Res.*, **3**, 1815–1822.
 17. Dheilly, E., Battistello, E., Katanayeva, N., Sungalee, S., Michaux, J., Duns, G., Wehrle, S., Sordet-Dessimoz, J., Mina, M., Racle, J., et al. (2020) Cathepsin S regulates antigen processing and T cell activity in non-Hodgkin lymphoma, *Cancer Cell*, **37**, 674–689, doi: 10.1016/j.ccell.2020.03.016.
 18. Haider, A. S., Peters, S. B., Kaporis, H., Cardinale, I., Fei, J., Ott, J., Blumenberg, M., Bowcock, A. M., Krueger, J. G., and Carucci, J. A. (2006) Genomic analysis defines a cancer-specific gene expression signature for human squamous cell carcinoma and distinguishes malignant hyperproliferation from benign hyperplasia, *J. Invest. Dermatol.*, **126**, 869–881, doi: 10.1038/sj.jid.5700157.
 19. Yang, L., Zeng, Q., Deng, Y., Qiu, Y., Yao, W., and Liao, Y. (2022) Glycosylated cathepsin V serves as a prognostic marker in lung cancer, *Front. Oncol.*, **12**, 876245, doi: 10.3389/fonc.2022.876245.
 20. Teller, A., Jechorek, D., Hartig, R., Adolf, D., Reißig, K., Roessner, A., and Franke, S. (2015) Dysregulation of apoptotic signaling pathways by interaction of RPLP0 and cathepsin X/Z in gastric cancer, *Pathol. Res. Pract.*, **211**, 62–70, doi: 10.1016/j.prp.2014.09.005.
 21. Kiuchi, S., Tomaru, U., Ishizu, A., Imagawa, M., Kiuchi, T., Iwasaki, S., Suzuki, A., Otsuka, N., Deguchi, T., Shimizu, T., et al. (2017) Expression of cathepsins V and S in thymic epithelial tumors, *Hum. Pathol.*, **60**, 66–74, doi: 10.1016/j.humpath.2016.09.027.
 22. Rudzińska, M., Parodi, A., Maslova, V. D., Efremov, Y. M., Gorokhovets, N. V., Makarov, V. A., Popkov, V. A., Golovin, A. V., Zernii, E. Y., and Zamyatnin, A. A. (2020) Cysteine cathepsins inhibition affects their expression and human renal cancer cell phenotype, *Cancers (Basel)*, **12**, 1310, doi: 10.3390/cancers12051310.
 23. Caliò, A., Brunelli, M., Gobbo, S., Argani, P., Munari, E., Netto, G., and Martignoni, G. (2021) Cathepsin K: a novel diagnostic and predictive biomarker for renal tumors, *Cancers (Basel)*, **13**, 2441, doi: 10.3390/cancers13102441.

24. Al-Hashimi, A., Venugopalan, V., Sereesongsang, N., Tedelind, S., Pinzaru, A. M., Hein, Z., Springer, S., Weber, E., Führer, D., Scott, C. J., et al. (2020) Significance of nuclear cathepsin V in normal thyroid epithelial and carcinoma cells, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.*, **1867**, 118846, doi: 10.1016/j.bbamcr.2020.118846.
25. Tedelind, S., Poliakova, K., Valeta, A., Hunegnaw, R., Yemanaberhan, E. L., Heldin, N. E., Kurebayashi, J., Weber, E., Kopitar-Jerala, N., Turk, B., Bogoyo, M., and Brix, K. (2010) Nuclear cysteine cathepsin variants in thyroid carcinoma cells, *Biol. Chem.*, **391**, 923-935, doi: 10.1515/BC.2010.109.
26. Kothapalli, R., Bailey, R. D., Kusmartseva, I., Mane, S., Epling-Burnette, P. K., and Loughran, T. P. (2003) Constitutive expression of cytotoxic proteases and down-regulation of protease inhibitors in LGL leukemia, *Int. J. Oncol.*, **22**, 33-39, doi: 10.3892/ijo.22.1.33.
27. Rudzinska-Radecka, M., Frolova, A. S., Balakireva, A. V., Gorokhovets, N. V., Pokrovsky, V. S., Sokolova, D. V., Korolev, D. O., Potoldykova, N. V., Vinarov, A. Z., Parodi, A., et al. (2022) *In silico, in vitro*, and clinical investigations of cathepsin B and stefin A mRNA expression and a correlation analysis in kidney cancer, *Cells*, **11**, 1455, doi: 10.3390/CELLS11091455.
28. El-Nadi, M., Hassan, H., Amer, M., Mohamed, M. M., El-Shinawi, M., and Ibrahim, S. A. (2019) Cathepsin L is a potential marker for triple-negative breast cancer, *Egypt. Acad. J. Biol. Sci. C Physiol. Mol. Biol.*, **11**, 29-36, doi: 10.21608/EAJBSC.2019.26817.
29. Vizin, T., Christensen, I., Nielsen, H., and Kos, J. (2012) Cathepsin X in serum from patients with colorectal cancer: relation to prognosis, *Radiol. Oncol.*, **46**, 207, doi: 10.2478/V10019-012-0040-0.
30. Tan, G.-J., Peng, Z.-K., Lu, J.-P., and Tang, F.-Q. (2013) Cathepsins mediate tumor metastasis, *World J. Biol. Chem.*, **4**, 91, doi: 10.4331/WJBC.V4.I4.91.
31. Chen, C. H., Bhasin, S., Khanna, P., Joshi, M., Joslin, P. M., Saxena, R., Amin, S., Liu, S., Sindhu, S., Walker, S. R., et al. (2019) Study of cathepsin B inhibition in VEGFR TKI treated human renal cell carcinoma xenografts, *Oncogenesis*, **8**, 15, doi: 10.1038/S41389-019-0121-7.
32. Gondi, C. S., and Rao, J. S. (2013) Cathepsin B as a cancer target, *Expert Opin. Ther. Targets*, **17**, 281, doi: 10.1517/14728222.2013.740461.
33. Sevenich, L., Schurigt, U., Sachse, K., Gajda, M., Werner, F., Müller, S., Vasiljeva, O., Schwinde, A., Klemm, N., Deussing, J., et al. (2010) Synergistic antitumor effects of combined cathepsin B and cathepsin Z deficiencies on breast cancer progression and metastasis in mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 2497, doi: 10.1073/PNAS.0907240107.
34. Soond, S. M., Kozhevnikova, M. V., Frolova, A. S., Savvateeva, L. V., Plotnikov, E. Y., Townsend, P. A., Han, Y. P., and Zamyatnin, A. A. (2019) Lost or forgotten: the nuclear cathepsin protein isoforms in cancer, *Cancer Lett.*, **462**, 43-50, doi: 10.1016/j.canlet.2019.07.020.
35. Hiwasa, T., and Sakiyama, S. (1996) Nuclear localization of procathepsin L/MEP in *ras*-transformed mouse fibroblasts, *Cancer Lett.*, **99**, 87-91, doi: 10.1016/0304-3835(95)04041-2.
36. Sullivan, S., Tosetto, M., Kevans, D., Coss, A., Wang, L., O'Donoghue, D., Hyland, J., Sheahan, K., Mulcahy, H., and O'Sullivan, J. (2009) Localization of nuclear cathepsin L and its association with disease progression and poor outcome in colorectal cancer, *Int. J. Cancer*, **125**, 54-61, doi: 10.1002/ijc.24275.
37. Senin, I. I., Tikhomirova, N. K., Churumova, V. A., Grigoriev, I. I., Kolpakova, T. A., Zinchenko, D. V., Philippov, P. P., and Zernii, E. Y. (2011) Amino acid sequences of two immune-dominant epitopes of recoverin are involved in Ca²⁺/recoverin-dependent inhibition of phosphorylation of rhodopsin, *Biochemistry (Moscow)*, **76**, 332-338, doi: 10.1134/S0006297911030060.
38. Dyer, R. B., and Herzog, N. K. (1995) Isolation of intact nuclei for nuclear extract preparation from a fragile B-lymphocyte cell line, *Biotechniques*, **19**, 192-195.
39. Olson, O. C., and Joyce, J. A. (2015) Cysteine cathepsin proteases: regulators of cancer progression and therapeutic response, *Nat. Rev. Cancer*, **15**, 712-729, doi: 10.1038/nrc4027.
40. Fujimoto, T., Tsunedomi, R., Matsukuma, S., Yoshimura, K., Oga, A., Fujiwara, N., Fujiwara, Y., Matsui, H., Shindo, Y., Tokumitsu, Y., et al. (2021) Cathepsin B is highly expressed in pancreatic cancer stem-like cells and is associated with patients' surgical outcomes, *Oncol. Lett.*, **21**, 30, doi: 10.3892/OL.2020.12291.
41. Singh, N., Das, P., Gupta, S., Sachdev, V., Srivasatava, S., Datta Gupta, S., Pandey, R. M., Sahni, P., Chauhan, S. S., and Saraya, A. (2014) Plasma cathepsin L: a prognostic marker for pancreatic cancer, *World J. Gastroenterol.*, **20**, 17532, doi: 10.3748/WJG.V20.146.17532.
42. Gocheva, V., Zeng, W., Ke, D., Klimstra, D., Reinheckel, T., Peters, C., Hanahan, D., and Joyce, J. A. (2006) Distinct roles for cysteine cathepsin genes in multistage tumorigenesis, *Genes Dev.*, **20**, 543-556, doi: 10.1101/gad.1407406.
43. Loh, C. Y., Chai, J. Y., Tang, T. F., Wong, W. F., Sethi, G., Shanmugam, M. K., Chong, P. P., and Looi, C. Y. (2019) The E-cadherin and N-cadherin switch in epithelial-to-mesenchymal transition: signaling, therapeutic implications, and challenges, *Cells*, **8**, 1118, doi: 10.3390/CELLS8101118.
44. Jevnikar, Z., Rojnik, M., Jamnik, P., Doljak, B., Fonović, U. P., and Kos, J. (2013) Cathepsin H

- mediates the processing of talin and regulates migration of prostate cancer cells, *J. Biol. Chem.*, **288**, 2201-2209, doi: 10.1074/JBC.M112.436394.
45. Wu, N., Wang, Y. Z., Wang, K. K., Zhong, B. Q., Liao, Y. H., Liang, J. M., and Jiang, N. (2022) Cathepsin K regulates the tumor growth and metastasis by IL-17/CTSK/EMT axis and mediates M2 macrophage polarization in castration-resistant prostate cancer, *Cell Death Dis.*, **13**, 813, doi: 10.1038/s41419-022-05215-8.
 46. Wang, J., Chen, L., Li, Y., and Guan, X. Y. (2011) Overexpression of cathepsin Z contributes to tumor metastasis by inducing epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma, *PLoS One*, **6**, 24967, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0024967.
 47. Sivaparthi, M., Sawaya, R., Gokaslan, Z. L., Chintala, K. S., and Rao, J. S. (1996) Expression and the role of cathepsin H in human glioma progression and invasion, *Cancer Lett.*, **104**, 121-126, doi: 10.1016/0304-3835(96)04242-5.
 48. Rojnik, M., Jevnikar, Z., Mirkovic, B., Janes, D., Zidar, N., Kikelj, D., and Kos, J. (2011) Cathepsin H indirectly regulates morphogenetic protein-4 (BMP-4) in various human cell lines, *Radiol. Oncol.*, **45**, 259, doi: 10.2478/V10019-011-0034-3.
 49. Burton, L. J., Dougan, J., Jones, J., Smith, B. N., Randle, D., Henderson, V., and Otero-Marah, V. A. (2017) Targeting the nuclear cathepsin L CCAAT displacement protein/cut homeobox transcription factor-epithelial mesenchymal transition pathway in prostate and breast cancer cells with the Z-FY-CHO inhibitor, *Mol. Cell. Biol.*, **37**, e00297-16, doi: 10.1128/MCB.00297-16.
 50. Lamort, A. S., Hamon, Y., Czaplewski, C., Gielon, A., Seren, S., Coquet, L., Lecaille, F., Lesner, A., Lalmanach, G., Gauthier, F., et al. (2019) Processing and maturation of cathepsin C zymogen: a biochemical and molecular modeling analysis, *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, 4747, doi: 10.3390/IJMS20194747.
 51. Brodaczevska, K. K., Szczylik, C., Fiedorowicz, M., Porta, C., and Czarnecka, A. M. (2016) Choosing the right cell line for renal cell cancer research, *Mol. Cancer*, **15**, 83, doi: 10.1186/S12943-016-0565-8.
 52. Sinha, R., Winer, A. G., Chevinsky, M., Jakubowski, C., Chen, Y. B., Dong, Y., Tickoo, S. K., Reuter, V. E., Russo, P., Coleman, J. A., et al. (2017) Analysis of renal cancer cell lines from two major resources enables genomics-guided cell line selection, *Nat. Commun.*, **8**, 15165, doi: 10.1038/ncomms15165.
 53. Carvalho, M., Ferreira, P. J., Mendes, V. S., Silva, R., Pereira, J. A., Jerónimo, C., and Silva, B. M. (2010) Human cancer cell antiproliferative and antioxidant activities of *Juglans regia* L., *Food Chem. Toxicol.*, **48**, 441-447, doi: 10.1016/j.fct.2009.10.043.
 54. Griffith, T. S., Fialkov, J. M., Williams, R. D., Scott, D. L., Azuhata, T., Sandler, A. D., Wall, N. R., and Altieri, D. C. (2002) Induction and regulation of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand/Apo-2 ligand-mediated apoptosis in renal cell carcinoma, *Cancer Res.*, **62**, 3093-3099.
 55. Yang, Z., Liu, Y., Qin, L., Wu, P., Xia, Z., Luo, M., Zeng, Y., Tsukamoto, H., Ju, Z., Su, D., et al. (2017) Cathepsin H-mediated degradation of HDAC4 for matrix metalloproteinase expression in hepatic stellate cells, *Am. J. Pathol.*, **187**, 781-797, doi: 10.1016/J.AJPAT.2016.12.001.
 56. Goulet, B., Sansregret, L., Leduy, L., Bogoyo, M., Weber, E., Chauhan, S. S., and Nepveu, A. (2007) Increased expression and activity of nuclear cathepsin L in cancer cells suggests a novel mechanism of cell transformation, *Mol. Cancer Res.*, **5**, 899-907, doi: 10.1158/1541-7786.MCR-07-0160.
 57. Tamhane, T., Llukumbura, R., Lu, S., Maeldandsmo, G. M., Haugen, M. H., and Brix, K. (2016) Nuclear cathepsin L activity is required for cell cycle progression of colorectal carcinoma cells, *Biochimie*, **122**, 208-218, doi: 10.1016/j.biochi.2015.09.003.
 58. Maubach, G., Lim, M. C., and Zhuo, L. (2008) Nuclear cathepsin F regulates activation markers in rat hepatic stellate cells, *Mol. Biol. Cell*, **19**, 4238-4248, doi: 10.1091/mbc.e08-03-0291.
 59. Goulet, B., Truscott, M., and Nepveu, A. A. (2006) Novel proteolytically processed CDP/Cux isoform of 90 kDa is generated by cathepsin L, *Biol. Chem.*, **387**, 1285-1293, doi: 10.1515/BC.2006.159.
 60. Feng, F., Zhao, Z., Zhou, Y., Cheng, Y., Wu, X., and Heng, X. (2021) CUX1 facilitates the development of oncogenic properties via activating Wnt/ β -catenin signaling pathway in glioma, *Front. Mol. Biosci.*, **8**, 705008, doi: 10.3389/FMOLB.2021.705008.
 61. Zhao, M., Mishra, L., and Deng, C. X. (2018) The role of TGF- β /SMAD4 signaling in cancer, *Int. J. Biol. Sci.*, **14**, 111, doi: 10.7150/IJBS.23230.
 62. Maruyama, T., Chen, W. J., and Shibata, H. (2022) TGF- β and cancer immunotherapy, *Biol. Pharm. Bull.*, **45**, 155-161, doi: 10.1248/BPB.B21-00966.
 63. Turk, B., Dolenc, I., Lenarcic, B., Krizaj, I., Turk, V., Bieth, J. G., and Björk, I. (1999) Acidic pH as a physiological regulator of human cathepsin L activity, *Eur. J. Biochem.*, **259**, 926-932, doi: 10.1046/j.1432-1327.1999.00145.x.
 64. Turk, B., Dolenc, I., Zerovnik, E., Turk, D., Gubensek, F., and Turk, V. (1994) Human cathepsin B is a metastable enzyme stabilized by specific ionic interactions associated with the active site, *Biochemistry*, **33**, 14800-14806, doi: 10.1021/bi00253a019.
 65. Paraoan, L., Ratnayaka, A., Spiller, D. G., Hiscott, P., White, M. R. H., and Grierson, I. (2004) Unexpected intracellular localization of the AMD-associated cystatin C variant, *Traffic*, **5**, 884-895, doi: 10.1111/J.1600-0854.2004.00230.X.

EXPRESSION, INTRACELLULAR LOCALIZATION AND MATURATION OF CYSTEINE CATHEPSINS IN RENAL EMBRYONIC AND CANCER CELL LINES

A. S. Frolova^{1,2}, N. K. Tikhomirova³, I. I. Kireev³, E. Yu. Zernii³, A. Parodi²,
K. I. Ivanov², and A. A. Zamyatnin, Jr.^{1,2,3,4*}

¹ *Institute of Molecular Medicine, Sechenov First Moscow State Medical University, 119991 Moscow, Russia*

² *Scientific Center for Translation Medicine, Sirius University of Science and Technology, 354340 Sochi, Russia*

³ *Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119992 Moscow, Russia; e-mail: zamyat@belozersky.msu.ru*

⁴ *Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, Lomonosov Moscow State University, 119234 Moscow, Russia*

Cysteine cathepsins play an important role in tumor development and metastasis. The expression of these enzymes is often increased in many types of tumor cells. Cysteine cathepsins contribute to carcinogenesis through a number of mechanisms, including proteolysis of extracellular matrix and signaling molecules on the cell surface, as well as degradation of transcription factors and disruption of signaling cascades in the cell nucleus. Distinct oncogenic functions have been reported for several members of the cysteine cathepsin family in various types of cancer, but a comparative study of all eleven cysteine cathepsins in one experimental model is still missing. In this work, we assessed and compared the expression, localization, and maturation of all eleven cysteine cathepsins in embryonic kidney cells HEK293 and kidney cancer cell lines 769-P and A-498. We found that the expression of cathepsins V, B, Z, L, and S was 3- to 9-fold higher in kidney tumor cells than in embryonic cells. We also showed that all cysteine cathepsins were present in varying amounts in the nucleus of both embryonic and tumor cells. Notably, more than half of the cathepsin Z or K and over 88% of cathepsin F were localized in tumor cell nuclei. Moreover, mature forms of cysteine cathepsins were more prevalent in tumor cells than in embryonic cells. These results can be further used to develop novel diagnostic tools and may assist in the investigation of cysteine cathepsins as potential therapeutic targets.

Keywords: cysteine cathepsins, subcellular localization, protein expression, protease maturation, renal cancer