

На правах рукописи



ФАТХУТДИНОВ НАЙЛЬ РАМИЛЕВИЧ

**МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К
ИНГИБИТОРАМ МЕТИЛТРАНСФЕРАЗЫ EZH2 ПРИ
СВЕТЛОКЛЕТОЧНОЙ КАРЦИНОМЕ ЯИЧНИКА С МУТАЦИЕЙ В
ГЕНЕ ARID1A**

03.01.04 – Биохимия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Казань – 2020

Работа выполнена на кафедре биохимии, биотехнологии и фармакологии ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» и в лаборатории Руганга Чжана онкологического центра Вистаровского института (Wistar institute, Филадельфия, США).

Научный руководитель: Доктор биологических наук, доцент
Киямова Рамзия Галлямовна

Официальные оппоненты: **Калинина Елена Валентиновна**

– доктор биологических наук, профессор кафедры биохимии им. академика Березова Т.Т. медицинского института федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский университет дружбы народов»

Дунаев Павел Дмитриевич

– кандидат медицинских наук, доцент кафедры общей патологии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Ведущая организация: федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится 30 апреля 2020 г. в 14:00 на заседании диссертационного совета КФУ.03.07. при Казанском (Приволжском) федеральном университете по адресу г. Казань, ул. Кремлевская д. 18, в зале заседания ученого совета (аудитория № 211)

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке им. Н.И. Лобачевского при Казанском (Приволжском) федеральном университете по адресу: 420008, Республика Татарстан, г. Казань, Ул. Кремлевская, д. 35.

Автореферат разослан «30 » марта 2020 г.

Учёный секретарь диссертационного совета
кандидат биологических наук, доцент



Кравцова О.А.

Актуальность темы исследования. Современные методы разработки лекарственных препаратов для терапии злокачественных опухолей базируются на изучении нарушений регуляции клеточных путей, приводящих к развитию онкологических заболеваний. К предложенным методам таргетной терапии относятся блокада HER2 при раке молочной железы, ингибиование BRAF при меланоме, PARP при раке молочной железы и раке яичника, и т.д. (Chapman и др., 2011; Slamon и др., 2001; Wiggans и др., 2015; Zimmer и др., 2018). Одним из примеров современной таргетной терапии для лечения злокачественных опухолей, являются ингибиторы метилтрансферазы EZH2, которые успешно проходят клинические испытания. EZH2 является метилтрасферазой гистонов, ди- и триметилирующей лизин 27 гистона H3 (H3K27Me2/3) и каталитической субъединицей комплекса регуляции структуры хроматина PRC2. Наличие данной эпигенетической метки приводит к присоединению гистона H3 к цепи ДНК и подавлению транскрипции на данном участке (Jones, Varambally, Arend, 2018). В опухолевых клетках зачастую наблюдаются нарушения регуляции функционирования EZH2, приводящие к подавлению транскрипции генов-супрессоров опухолей. Ингибиование EZH2 было предложено в качестве лечения одного из подтипов эпителиального рака яичника - светлоклеточной карциномы яичника (СКЯ) с мутациями в гене *ARID1A* (Рис. 1; Bitler и др., 2015). Данный подтип рака яичника характеризуется низкой чувствительностью к применяемым химиотерапевтическим препаратам и относительно неблагоприятным прогнозом. Важнейшей особенностью СКЯ является высокая частота мутаций в гене *ARID1A*, составляющая около 40-60%, причем 90% мутаций приводят к потере экспрессии белка (Jones и др., 2010). Данный белок является связывающейся с ДНК субъединицей ремоделера хроматина SWI/SNF – одного из важнейших эпигенетических регуляторов (Wilson, Roberts, 2011). Комплекс SWI/SNF регулирует транскрипцию своих мишней, перемещая гистоны вокруг регулирующих элементов на хроматине, таким образом, изменяя доступность хроматина для факторов транскрипции.

На основании экспериментальных наблюдений была выдвинута гипотеза, согласно которой при мутациях в генах, кодирующих субъединицы комплекса SWI/SNF, нарушается транскрипция генов, зависящих от antagonизма EZH2 и SWI/SNF. Таким образом, при потере активности SWI/SNF в результате мутаций в одном из компонентов комплекса, например в гене *ARID1A*,

наблюдается увеличение функциональной активности метилтрансферазы EZH2 и подавление транскрипции генов-супрессоров опухолей (Wilson и др., 2010). Пример такого antagonизма наблюдается при СКЯ с мутациями в гене *ARID1A*. При потере экспрессии гена *ARID1A*, EZH2 метилирует гистоны в промоторном участке супрессора опухолей *PIK3IP1*, что приводит к подавлению транскрипции данного гена. Таким образом, при отсутствии экспрессии *PIK3IP1*, вызванном метилтрансферазной активностью EZH2, сигнальный путь PIK3/AKT активируется и поддерживает пролиферацию опухолевых клеток. Применение ингибиторов EZH2, таких как GSK126, предотвращает супрессорное воздействие

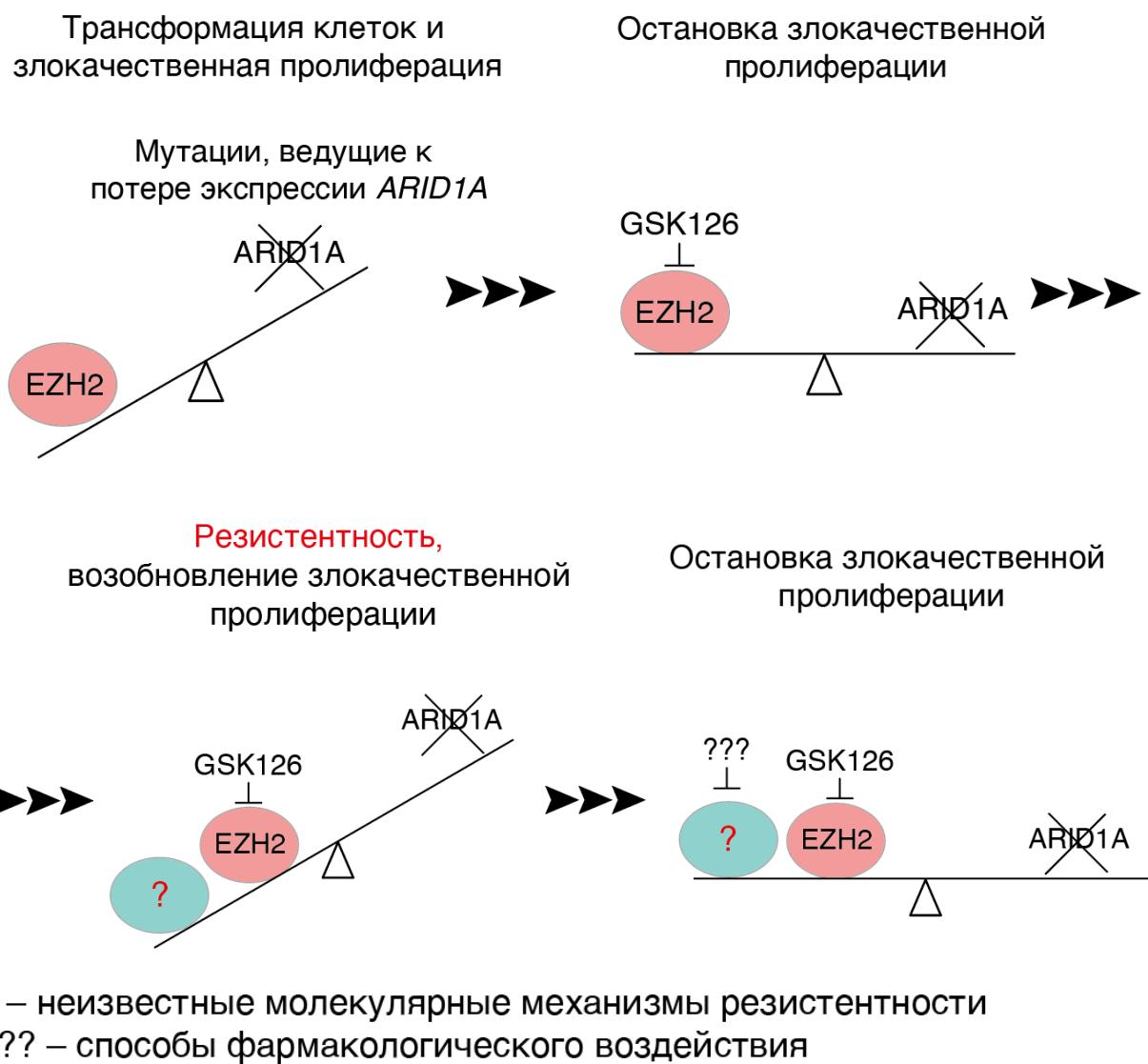


Рисунок 1 – Схематическое описание общей проблематики исследования

EZH2 на ген *PIK3IP1*, восстанавливая его экспрессию, что ведет к подавлению клеточного пути PIK3/АКТ и дальнейшей гибели опухолевых клеток (Рис. 1). Однако, известно, что применение любой таргетной терапии приводит к выработке резистентности к применяемому препарату. Для борьбы с резистентностью к таргетным терапиям необходимо глубокое понимание механизмов, лежащих в основе ее возникновения, и обнаружение новых генов-мишеней для фармакологического воздействия на резистентные клетки, а также разработка способов увеличения эффективности предложенных методов лечения (Рис. 1).

Таким образом, актуальность проблемы состоит в отсутствии эффективных методов преодоления резистентности к перспективным ингибиторам EZH2 при СКЯ с мутацией в гене *ARID1A*. Понимание молекулярных механизмов приспособления к ингибиторам EZH2, лежащих в основе приобретенной резистентности поможет разработать методы более эффективной борьбы со светлоклеточной карциномой яичника с мутацией в гене *ARID1A*.

Целью работы является идентификация молекулярных механизмов резистентности к ингибиторам метилтрансферазы EZH2 при светлоклеточной карциноме яичника с мутацией в гене *ARID1A* и подбор ингибиторов для преодоления приобретенной резистентности.

Для достижения цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Получение клеточной линии светлоклеточной карциномы яичника с мутацией в гене *ARID1A*, резистентной к ингибиторам EZH2.
2. Определение изменений в составе комплекса ремоделирования нуклеосом SWI/SNF в резистентной к ингибиторам метилтрансферазы EZH2 и родительской клеточной линии светлоклеточной карциномы яичника с мутацией в гене *ARID1A*.
3. Характеристика субъединиц комплекса SWI/SNF, регулирующих резистентность к ингибиторам EZH2 при светлоклеточной карциноме яичника.
4. Выявление и анализ потенциальных мишеней для фармакологического воздействия в клетках светлоклеточной карциномы яичника с мутацией в гене *ARID1A*, резистентных к ингибиторам метилтрансферазы EZH2.
5. Подбор ингибиторов и их комбинаций для увеличения эффективности таргетной терапии светлоклеточной карциномы яичника с мутацией в гене *ARID1A*.

Научная новизна. Впервые исследованы механизмы резистентности клеток светлоклеточной карциномы яичника к ингибиторам EZH2. Впервые показана роль каталитических субъединиц SMARCA2 и SMARCA4 комплекса ремоделирования хроматина SWI/SNF в развитии резистентности к ингибиторам метилтрансферазы EZH2, которое сопровождается увеличением экспрессии белков, вовлеченных в негативную регуляцию апоптоза. Выявлена зависимость клеток, резистентных к ингибиторам EZH2 от экспрессии белка-супрессора апоптоза BCL2. Показано, что применение BH3-миметиков, таких как ABT263, связывающихся с антиапоптическими белками и блокирующих их функции, приводит к запуску апоптоза и уменьшает рост опухолей светлоклеточной карциномы яичника, резистентных к ингибиторам EZH2. Выявлено, что использование ингибитора ABT263, направленного к белку-супрессору апоптоза BCL2 в комбинации с ингибитором GSK126, направленного против метилтрансферазы EZH2 оказывает синергический эффект на подавление роста клеток светлоклеточной карциномы яичника с мутацией в гене *ARID1A*. В рамках диссертационного исследования впервые было продемонстрировано влияние компонентов комплекса SWI/SNF на чувствительность к ингибиторам BCL2 и EZH2.

Теоретическая и практическая значимость работы. Результаты проведенного диссертационного исследования демонстрируют важность изучения эпигенетического регулирования транскрипции в опухолевых клетках, так как данная область позволяет открыть ранее неизвестные мишени для противоопухолевой терапии светлоклеточной карциномы яичника (СКЯ).

Результаты работы указывают на ключевую роль субъединицы комплекса SWI/SNF SMARCA4 в резистентности к ингибиторам EZH2 при СКЯ с мутацией в гене *ARID1A*. Полученные данные свидетельствуют о зависимости СКЯ с мутацией в гене *ARID1A*, резистентной к ингибиторам EZH2, от экспрессии антиапоптических белков, в частности, BCL2. Кроме того, результаты исследования описывают синергетическое взаимодействие ингибиторов GSK126 и ABT263, направленных к белкам EZH2 и BCL2 соответственно в наивных клетках СКЯ, несущих мутацию в гене *ARID1A*. Результаты проведенного исследования расширяют понимание механизмов эпигенетического регулирования, способных приводить к развитию резистентности к таргетным препаратам, в частности к ингибиторам EZH2 при лечении СКЯ. Учитывая что, как ингибиторы BCL2, так и ингибиторы EZH2 в данный момент проходят клинические испытания,

наши результаты важны для разработки новых стратегий лечения опухолей светлоклеточной карциномы яичника с мутацией в гене *ARID1A*. Кроме того, материалы диссертационного исследования могут быть использованы в научно-исследовательской работе в изучении молекулярных механизмов развития резистентности к противоопухолевым таргетным препаратам и методов преодоления приобретенной резистентности.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. В клетках светлоклеточной карциномы яичника с мутацией в гене *ARID1A*, резистентных к ингибиторам метилтрансферазы EZH2, каталитические субъединицы SMARCA2 и SMARCA4 комплекса ремоделирования хроматина SWI/SNF принимают участие в механизмах резистентности к ингибиторам метилтрансферазы EZH2, что сопровождается увеличением экспрессии генов, подавляющих апоптоз.
2. Клетки светлоклеточной карциномы яичника с мутацией в гене *ARID1A*, резистентные к ингибиторам метилтрансферазы EZH2, чувствительны к ингибиторам BCL2.
3. Комбинирование ингибиторов GSK126 и ABT263 в нативных опухолях синергически подавляет рост клеток СКЯ с мутацией в гене *ARID1A*.

Достоверность результатов исследований определяется значительным экспериментальным материалом, использованием стандартизованных методик, детальным анализом результатов, полученных на современном оборудовании, и использованием методов статистической обработки данных. Кроме этого, обсуждение результатов на научных конференциях с участием ведущих специалистов в данной области, а также публикации результатов в рецензируемых российских и зарубежных научных изданиях, свидетельствуют о достоверности полученных результатов работы.

Апробация работы. Материалы и основные результаты диссертационного исследования были представлены на ежегодной конференции студентов и аспирантов Вистаровского института (Филадельфия, США, 2016, 2017) и проходящем раз в два года симпозиуме по исследованию рака яичника Rivkin Ovarian Cancer Foundation (Сиэтл, США, 2018).

Материалы диссертации используются в учебном процессе кафедры биохимии, биотехнологии и фармакологии для преподавания разделов «Молекулярные основы канцерогенеза», «Молекулярные маркеры

злокачественных новообразований» и «Молекулярные маркеры при онкотрансформации клеток». Казанского федерального университета и в научно-исследовательской работе НИЛ «Биомаркер» и «МОТОЗ» в изучении молекулярных механизмов развития резистентности к противоопухолевым таргетным терапиям.

Связь работы с научными программами и собственный вклад автора в исследования. Работа выполнялась в рамках научных направлений научно-исследовательских лабораторий «Биомаркер» и «МОТОЗ» по изучению механизмов химиорезистентности рака яичника при поддержке программы ППК (повышения конкурентной способности среди ВУЗов). Экспериментальные данные получены непосредственно автором исследования за время работы на кафедре биохимии, биотехнологии и фармакологии ИФМиБ КФУ (Казань) и в Вистаровском институте (Филадельфия, США).

Публикация результатов исследования. По материалам диссертации опубликовано 6 печатных работ, в том числе 5 статей в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК, а также индексируемых в базах данных Scopus и Web of Science, и один тезис доклада на международной конференции.

Структура и объем диссертационной работы. Данная научная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов, их обсуждения, выводов и списка использованной литературы. Работа изложена на 137 страницах машинописного текста, включает 6 таблиц и 33 рисунка. Библиография включает 189 наименований.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.

Объекты исследования. Объектом исследования были выбраны опухолевые клеточные культуры линии светлоклеточной карциномы яичника человека TOV21G, SKOV3, OVCA429, а также первичные культуры светлоклеточной карциномы человека VOA4841 и XVOA295. Эксперименты *in vivo* проводили на линиях трансгенных мышей C57BL/6-ARID1A^{fl/fl}Pik3caH1047R и NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rgt^{m1Wjl}/SzJ.

Исследование пролиферации опухолевых клеток *in vitro*. Оценку пролиферации опухолевых клеток производили методом формирования колоний. Клетки рассеивали в 24-луночные планшеты в присутствии ингибиторов, среду меняли раз в три дня. Контроль за ростом и плотностью клеток осуществляли с помощью инвертированного светового микроскопа TS100 (Nikon). По окончании

инкубации клетки фиксировали и окрашивали 0,005% раствором кристального фиолетового.

Расчет комбинационного индекса. Действие препаратов определяли на основе анализа пролиферации клеток *in vitro* по методу уравнения медианного эффекта (Chou, 2010). Данные рассчитывали с помощью программы CompuSyn. Эффект каждого ингибитора сравнивали с эффектом комбинации препаратов. Взаимодействие препаратов считали синергичным при $CI < 1$, антагонистическим при $CI > 1$, и аддитивным при $CI = 1$.

Инфекция лентивирусными частицами. Для упаковки лентивирусных частиц использовали плазмиды pLKO.1-кшBCL2 (Broad Institute), pLKO.1-кшSMARCA4, pLX304-ARID1A, pLX304-SMARCA2 (Broad Institute), psPAX2 (Addgene) и pMD2.G (Addgene) и клеточная линия HEK293FT. Для трансфекции плазмид использовали реагент FuGENE6 (Invitrogen) и среду OptiMem (Thermo Fisher Scientific). Среду, содержащую вирусные частицы, собирали спустя 72 часа с момента трансфекции.

Анализ экспрессии белков методом вестерн-блоттинга. Для приготовления белковых лизатов клетки ресусцинировали в буфере RIPA (150мМ хлорид натрия, 1% NP-40, 0.5% деоксихолат натрия, 0.1% ДСН, 25мМ Трис) и собирали растворимую фракцию (супернатант). Белки разделяли методом электрофореза в 6-15% полиакриламидном геле в денатурирующих условиях, после чего переносили на поливинилиденфторидную мембрану. Мембрану с белками блокировали, инкубировали с первичными и вторичными антителами и детектировали сигнал с использованием коммерческого набора SuperSignal West Pico Plus (Thermo Fisher Scientific).

Анализ коиммунопреципитации белков. Для анализа коиммунопреципитации белков, ядерную фракцию клеток выделяли путем инкубации клеток в гипотоническом буфере, после чего ядра лизировали в буфере RIPA и инкубировали с первичными антителами. После инкубации в раствор добавляли магнитные частицы, покрытые белком A (Invitrogen). Далее, коньюгированные белки элюировали с помощью буфера для загрузки образцов в гели и проводили анализ методом иммуноблоттинга.

Анализ композиции комплексов SWI/SNF в градиенте сахарозы. Клеточные ядра лизировали в буфере, содержащем 0,3М сульфат аммония, после чего центрифугированием удаляли нерастворимую хроматиновую фракцию. Далее

белки осаждали центрифугированием в буфере, содержащем 300 мг/мл сульфат аммония, полученный осадок разбавляли и насыщали на 10-50% градиент сахарозы. По окончании центрифугирования слои градиента объемом 450мкл собирали и подвергали анализу методом вестерн-блоттинга.

Анализ коиммунопреципитации хроматина. Клетки фиксировали в 1% растворе формальдегида и лизировали в солевом буфере. Далее хроматин расщепляли с помощью микрококковой нуклеазы и инкубировали с первичными антителами. После инкубации в раствор добавляли магнитные микрочастицы, покрытые Белком А+Г, в соотношение 50 мкл на 10 мкг первичных антител. Далее магнитные частицы отмывали и хроматин элюировали. После элюирования хроматин очищали от белков с помощью протеиназы-К и выделяли с использованием коммерческого набора Gel extraction kit (Qiagen). Очищенная ДНК была использована для постановки кПЦР.

Выделение РНК и количественная полимеразная цепная реакция (ПЦР). РНК выделяли с помощью набора RNeasy mini kit (Qiagen) согласно инструкциям производителя. Количественную ПЦР с обратной транскрипцией проводили с использованием набора iTaq Universal One-Step RT-qPCR Kit (BioRad) согласно инструкциям производителя.

Секвенирование РНК и биоинформационический анализ. Для секвенирования, выделенную РНК инкубировали с ДНКазой I (Qiagen) и очищали с помощью коммерческого набора RNeasy MinElute Cleanup Kit (Qiagen). Библиотеки для секвенирования готовили с помощью TruSeq Total RNA Sample Prep Kit (Illumina). Библиотеки секвенировали с помощью Illumina NExtSeq500. Данные секвенирования выравнивали с использованием алгоритма bowtie2 против hg19 версии человеческого генома. Программное обеспечение RSEM v1.2.12 использовали для подсчета количества чтений и количества прочтений на килобазу на картированные риды. Анализ изменений клеточных путей проводили с помощью программного обеспечения QIAGEN's Ingenuity® Pathway Analysis (Jiménez-Marín и др., 2009).

Иммуногистохимическое окрашивание и анализ. Опухоли фиксировали в 10% растворе формалина (Thermo Fisher Scientific). Далее опухоли заливали парафином, рассекали на микротоме и накладывали на препараторное стекло. Срезы депарафинировали путем инкубации в ксилоле, регидрировали в растворах этанола концентраций 100-70% и отмывали водой. Демаскировку антигенов проводили

инкубацией препаратов в цитратном буфере на водяной бане. Далее блокировали эндогенную пероксидазу путем инкубации образцов в 5% растворе перекиси водорода в метаноле. Затем препараты промывали в НФБ и блокировали в 3% растворе бычьего сывороточного альбумина, после чего отмывали в НФБ и инкубировали с первичными антителами. Далее препараты промывали в НФБ и инкубированы со вторичными антителами. По окончании инкубации препараты отмывали и визуализировали с использованием DAB+ Substrate Chromogen System (Dako).

Статистическая обработка данных. Статистическую обработку полученных данных производили с использованием статистического программного обеспечения GraphPad Prism. Сравнение осуществляли с использованием t-критерия Стьюдента или дисперсионного анализа One-way ANOVA. Статистически значимым считали значение $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Получение и характеристика модельной клеточной линии светлоклеточной карциномы яичника TOV21G, резистентной к ингибиторам метилтрансферазы EZH2

Для исследования потенциальных механизмов, участвующих в резистентности к ингибиторам EZH2, была выведена клеточная линия светлоклеточной карциномы яичника (СКЯ) с мутацией в гене *ARID1A* – TOV21G, резистентная к ингибиторам EZH2. Для этого родительские клетки TOV21G инкубировали с повышающимися дозами GSK126 – ингибитора EZH2, показавшего эффективность на доклинических моделях эпителиального рака яичника (ЭРЯ) (Wang и др., 2017; Yi и др., 2017). Были использованы концентрации GSK126 в 1, 5, 10, 20, 40 мкмоль, на каждой ступени культивировали клетки в течение трех недель. Для последующих экспериментов были отобраны два потенциальных резистентных клона. Полученные в результате селекции клетки обладали значением IC₅₀ в ~10 раз выше, чем родительские клетки, чувствительные к ингибиторам EZH2 ($12,1 \pm 0,23$ и $11,9 \pm 0,38$ мкмоль против $1,2 \pm 0,08$ мкмоль) (Рис. 2А), что свидетельствует о том, что отобранные клоны являются резистентными к действию ингибитора метилтрансферазы GSK126 и приобретенная резистентность не влияет на экспрессию ARID1A или EZH2 (Рис 2Б). Наблюдаемая резистентность не была связана с восстановлением

метилтрансферазной активности EZH2, поскольку мы не наблюдали метилированного гистона H3 при вестерн-блот анализе (Рис. 2Б).

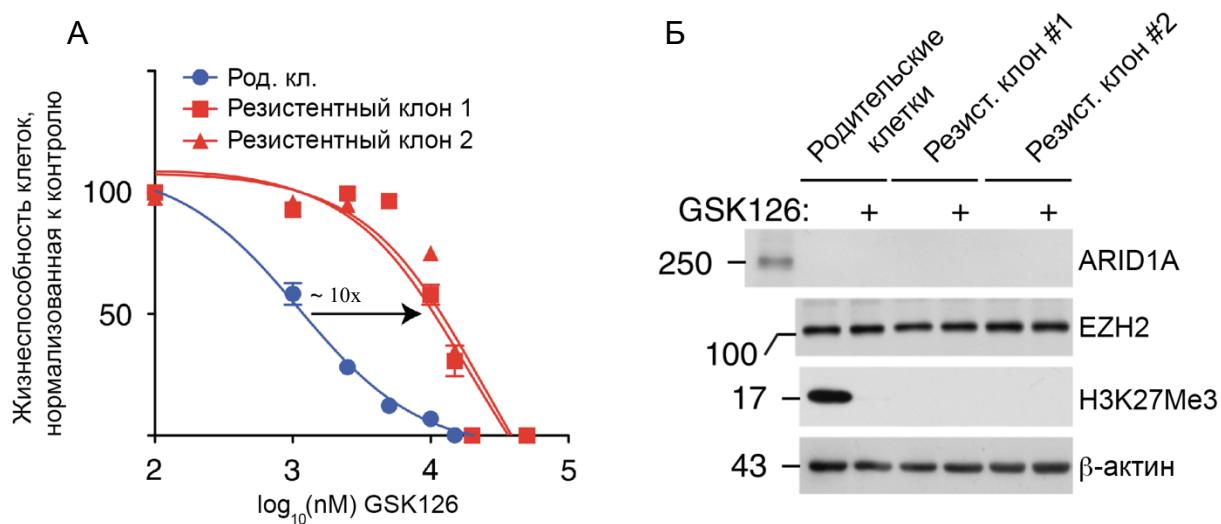


Рисунок 2 – А: Чувствительность к ингибитору EZH2 GSK126 в родительских клетках TOV21G и резистентных клонах; Б: Вестерн-блот анализ уровней экспрессии ARID1A, EZH2, H3K27Me3 и β-актина в родительских клетках TOV21G и резистентных клонах

Таким образом, была получена клеточная линия светлоклеточной карциномы яичника TOV21G, резистентная к ингибитору метилтрансферазы EZH2 - GSK126 и было показано, что приобретенная резистентность не связана с восстановлением метилтрансферазной активности EZH2 или восстановлением экспрессии *ARID1A*.

Определение влияния резистентности к ингибиторам EZH2 на состав комплекса SWI/SNF

Поскольку предварительно была продемонстрирована важная роль комплекса SWI/SNF в чувствительности СКЯ к ингибированию EZH2 (Bitler и др., 2015), было решено исследовать изменения в составе SWI/SNF при резистентности к ингибиторам EZH2. Для этого мы иммунопреципитировали комплекс SWI/SNF из клеток, резистентных к ингибиторам EZH2 и родительских клеток с помощью антител против субъединицы функционального ядра SWI/SNF – SMARCC1, и провели масс-спектрометрическое исследование состава белковых комплексов SWI/SNF.

Анализ композиции комплексов SWI/SNF показал повышенное содержание белка SMARCA2 и пониженное содержание белка SMARCA4, что может приводить к возможным изменениям в функциональной активности SWI/SNF (Рис. 3А). Данное наблюдение было подтверждено при анализе субъединиц функционального ядра SWI/SNF – SMARCC1 и SMARCB1 методом коиммунопреципитации с последующим вестерн-блот анализом (Рис. 3Б, В). Данные субъединицы включены во все функциональные комплексы SWI/SNF. Анализ содержания белка в родительских клетках TOV21G и резистентных клонах показал, что резистентные клетки содержали больше SMARCA2 и меньше SMARCA4, тогда как содержание других субъединиц SWI/SNF не менялось (Рис.

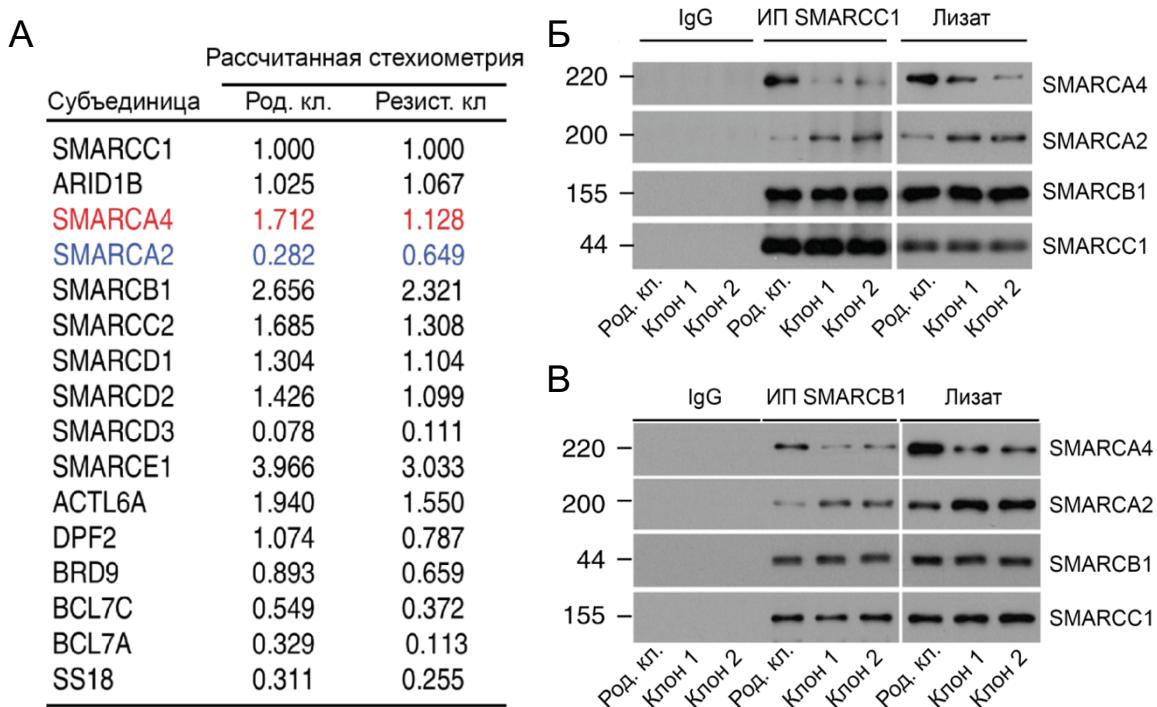


Рисунок 3 – А: стехиометрия соотношения субъединицы SWI/SNF SMARCC1 к остальным субъединицам; Б: Вестерн-блот анализ субъединиц SWI/SNF коиммунопреципитированных с субъединицей функционального ядра SWI/SNF – SMARCC1; В: Вестерн-блот анализ субъединиц SWI/SNF коиммунопреципитированных с субъединицей функционального ядра SWI/SNF – SMARCB1.

4А).

Стоит отметить, что определение регуляции экспрессии данных субъединиц крайне важна для полного понимания механизмов, лежащих в основе возникновения резистентности к ингибиторам EZH2. Для этого мы провели анализ содержания мРНК *SMARCA4* и *SMARCA2*. Согласно полученным данным, понижение экспрессии *SMARCA4* и повышение экспрессии *SMARCA2* происходят на уровне мРНК, что говорит о транскрипционной регуляции процесса резистентности к ингибиторам EZH2 (Рис. 4Б). Резистентные клонсы обладали на $61,3 \pm 3,2\%$ и на

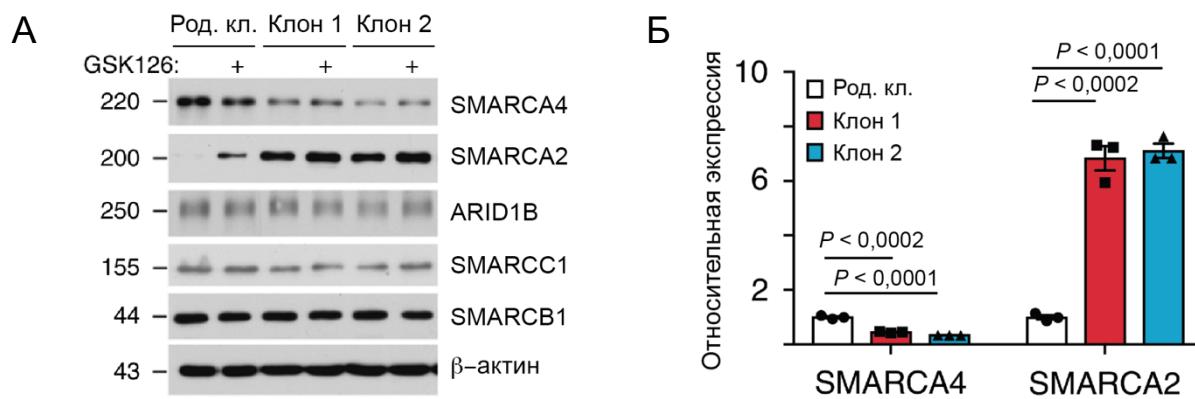


Рисунок 4 – А: Анализ экспрессии субъединиц SWI/SNF и β -актина в родительских и резистентных клетках; Б: Уровень экспрессии мРНК *SMARCA4* и *SMARCA2* в родительских и резистентных клетках

$75,3 \pm 2,8\%$ меньшим содержанием мРНК *SMARCA4*, и в $6,8 \pm 0,4$ раз и $7,1 \pm 0,23$ раз большим содержанием мРНК *SMARCA2*, чем родительские клетки (Рис. 4Б).

Таким образом, в резистентных клетках увеличивается содержание субъединицы SWI/SNF *SMARCA2* и снижается содержание субъединицы *SMARCA4*, при этом регуляция экспрессии генов *SMARCA2* и *SMARCA4* происходит на транскрипционном уровне.

Влияние SMARCA4 на изменение экспрессии катализитических субъединиц SWI/SNF и резистентность к ингибиторам EZH2

Для того чтобы определить влияние снижения *SMARCA4* и/или увеличения *SMARCA2* на приобретенную резистентность к ингибиторам EZH2, мы провели нокдаун *SMARCA4* в родительских клетках СКЯ с мутацией в гене *ARID1A*, линии TOV21G с использованием лентивирусных частиц, несущих вектор pLKO.1-кш*SMARCA4* (Рис. 5А). Нокдаун *SMARCA4*

привел к увеличению экспрессии белка SMARCA2 (Рис. 5А). Кроме того, снижение экспрессии *SMARCA4* привело к повышению резистентности к ингибитору EZH2: уровень пролиферации клеток, обработанных 5 мкмоль GSK126, изменился с $28,7\pm2,8\%$ до $77\pm2,6\%$ и $70,5\pm2,3\%$ для 1 и 2 кшРНК соответственно (Рис. 5Б). Далее, мы эктопически экспрессировали SMARCA2 в клетках линии TOV21G путем трансдукции лентивирусными частицами, несущими вектор pLX304-SMARCA2 (Рис. 5В). Эктопическая экспрессия не повлияла на содержание субъединицы SMARCA4 в клетках TOV21G (Рис. 5В). Кроме того, изменение содержания SMARCA2 не оказалось значимого

влияния на чувствительность клеток к 5 мкмоль GSK126 (Рис. 5Г).

Таким образом, понижение уровня экспрессии гена *SMARCA4* отвечает за резистентность к ингибиторам EZH2 при светлоклеточной карциноме яичника с мутацией в гене *ARID1A*. Следовательно, представляет интерес выявление генов, вовлеченных в механизмы резистентности клеток светлоклеточной карциномы яичника с мутацией в гене *ARID1A* среди тех генов, регуляцию которых осуществляет *SMARCA4*.

Выявление потенциальных мишеней для фармакологического

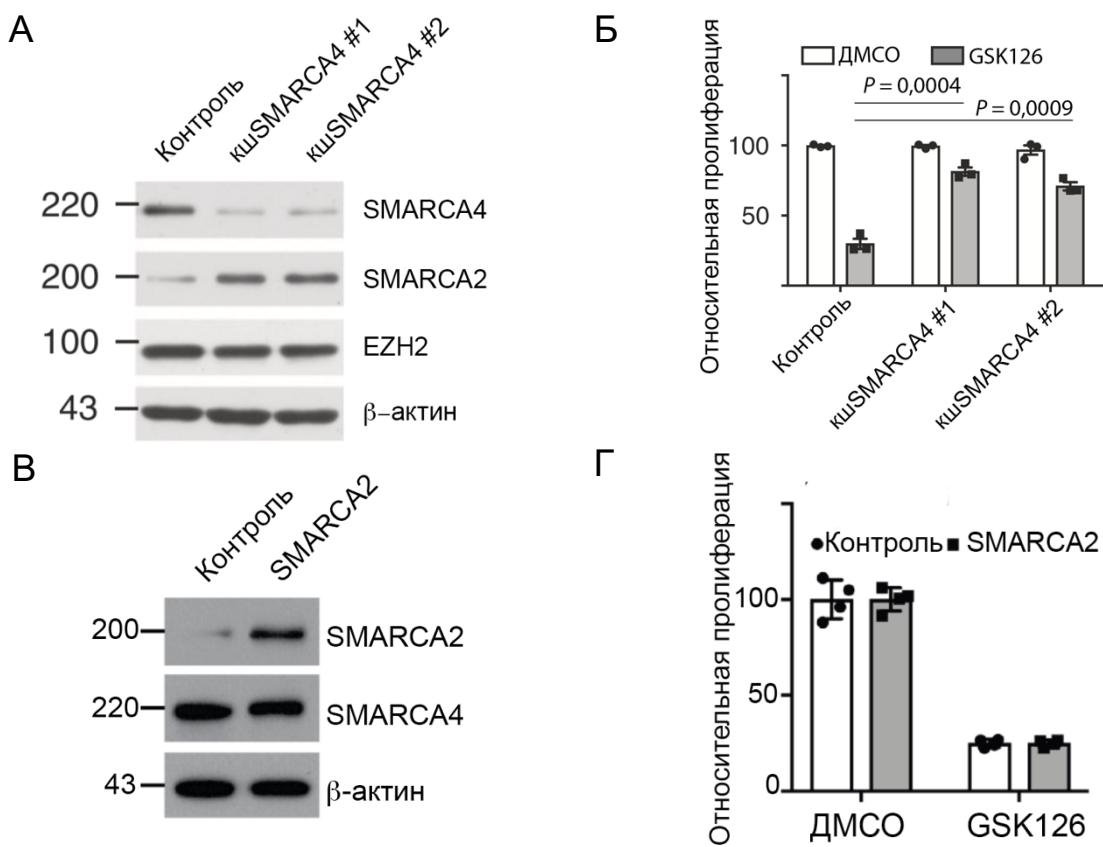


Рисунок 5 – А: Анализ содержания SMARCA4, SMARCA2, EZH2 и β-актина в родительских клетках TOV21G, инфицированных контрольными или кшSMARCA4-векторами; Б. Расчет пролиферации клеток из А; В Анализ содержания SMARCA2, SMARCA4 и β-актина в клетках линии TOV21G, инфицированных вектором, несущим SMARCA2 или контрольным вектором; Г: Расчет пролиферации клеток линии TOV21G, инфицированных вектором, несущим SMARCA2-FLAG или контрольным вектором и обработанных ДМСО или GSK126;

воздействия в клетках светлоклеточной карциномы яичника с мутацией в гене *ARID1A*, резистентных к ингибиторам метилтрансферазы EZH2

Поскольку потеря экспрессии SMARCA4 играет непосредственную роль в резистентности к ингибиторам EZH2, мы проанализировали гены, напрямую регулируемые SMARCA4 в родительских клетках и клетках, резистентных к ингибированию EZH2. Для этого мы провели анализ секвенирования РНК из родительских клеток и клеток, резистентных к ингибиторам EZH2 и иммунопреципитацию хроматина с использованием антител против SMARCA4. Для понимания эффекта SMARCA4 на резистентность, мы провели перекрестное сравнение пиков локализации SMARCA4 на хроматине и РНК-секвенирования из родительских и резистентных клеток (Рис. 6В). Так как важное значение имеет определение целей для противодействия резистентности к ингибиторам EZH2, мы сосредоточились на генах, экспрессия которых в резистентных клетках была увеличена. Анализ данных секвенирования РНК указал на повышенную экспрессию гена *BCL2* – кодирующего ключевой белок клеточных путей, подавляющих апоптоз (Рис. 6А). При этом анализ клеточных путей указал на пониженную экспрессию генов, активирующих апоптоз (Рис. 6Б).

Таким образом, резистентность к ингибиторам EZH2 в клетках СКЯ с мутацией в гене *ARID1A* сопровождается снижением экспрессии генов клеточных путей апоптоза, и повышением экспрессии одного из ключевых генов-супрессоров апоптоза – *BCL2*. Для определения целесообразности использования *BCL2* в качестве мишени для фармакологического воздействия необходимо определить функциональную значимость *BCL2* для клеток СКЯ с мутацией в гене *ARID1A*, резистентных к ингибиторам EZH2.

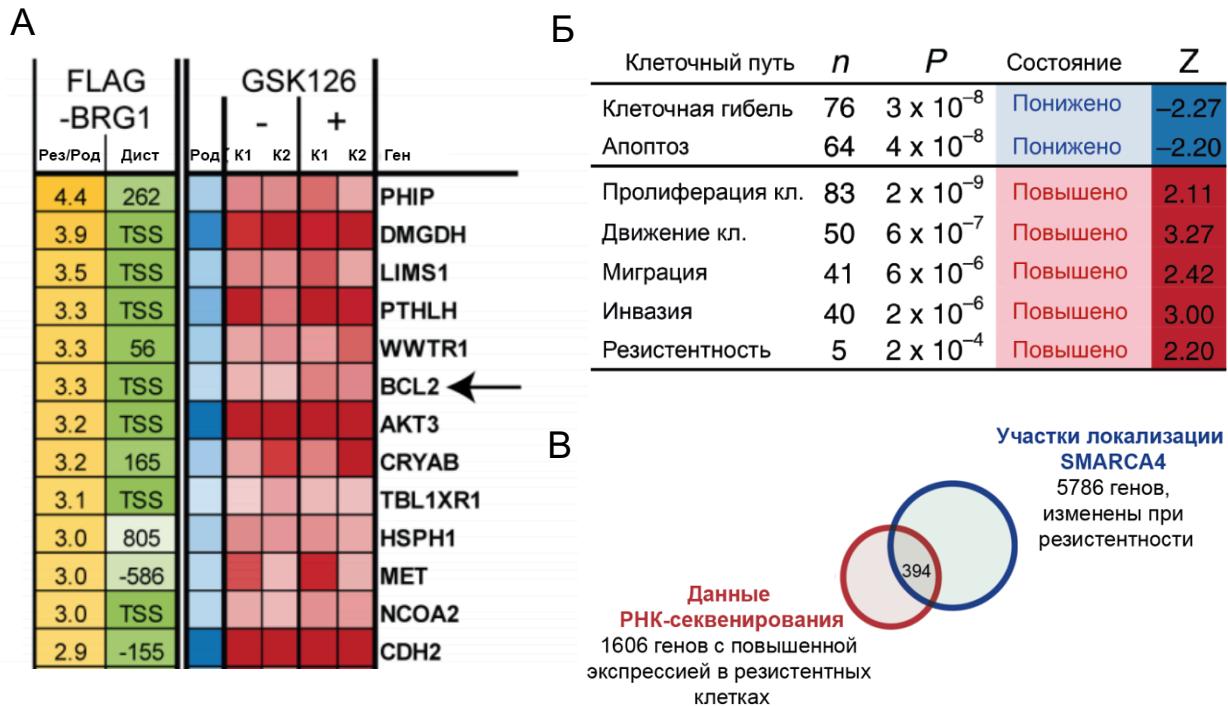


Рисунок 6 – А: Список прямых мишеней SMARCA4, участвующих в подавлении апоптоза, с увеличенной экспрессией в резистентных клетках; Б: Анализ клеточных путей, измененных после возникновения резистентности к EZH2; В: Схема анализа для выявления мишеней для таргетинга; К1/2 – клон 1/2

Определение эффективности ингибиования BCL2 *in vitro* на моделях светлоклеточной карциномы яичника, резистентных к ингибиторам EZH2

После выявления BCL2 в качестве потенциальной мишени для фармакологического воздействия, было решено проверить зависимость резистентных клеток СКЯ с мутацией в гене ARID1A от экспрессии BCL2. Для этого мы провели нокдаун BCL2 в родительских и резистентных клетках СКЯ линии TOV21G с использованием лентивирусных частиц, несущих кшРНК (Рис. 7А). Ингибиование клеточного роста при использовании кшРНК против гена BCL2 составило $29,7 \pm 3,5\%$ и $36,4 \pm 4\%$ в родительских клетках и $81 \pm 2,1\%$ и $75 \pm 1,1\%$ в клетках резистентного клона для кшРНК 1 и 2 соответственно (Рис. 7Б). Соответственно, клетки, резистентные к ингибиторам EZH2, были чувствительны к ингибитору BCL2 – ABT263. Применение 0.5 мкмоль ABT263 привело к существенному снижению роста резистентных клеток (Рис. 7В). Далее, мы использовали ингибитор BCL2 - ABT263 для определения чувствительности

резистентных клеток линии TOV21G к ингибиованию BCL2. При использовании 0,5 мкмоль ABT263 на резистентных клетках наблюдалось увеличение маркеров апоптоза - p85 PARP и расщепленной каспазы 3 (Рис.7Г).

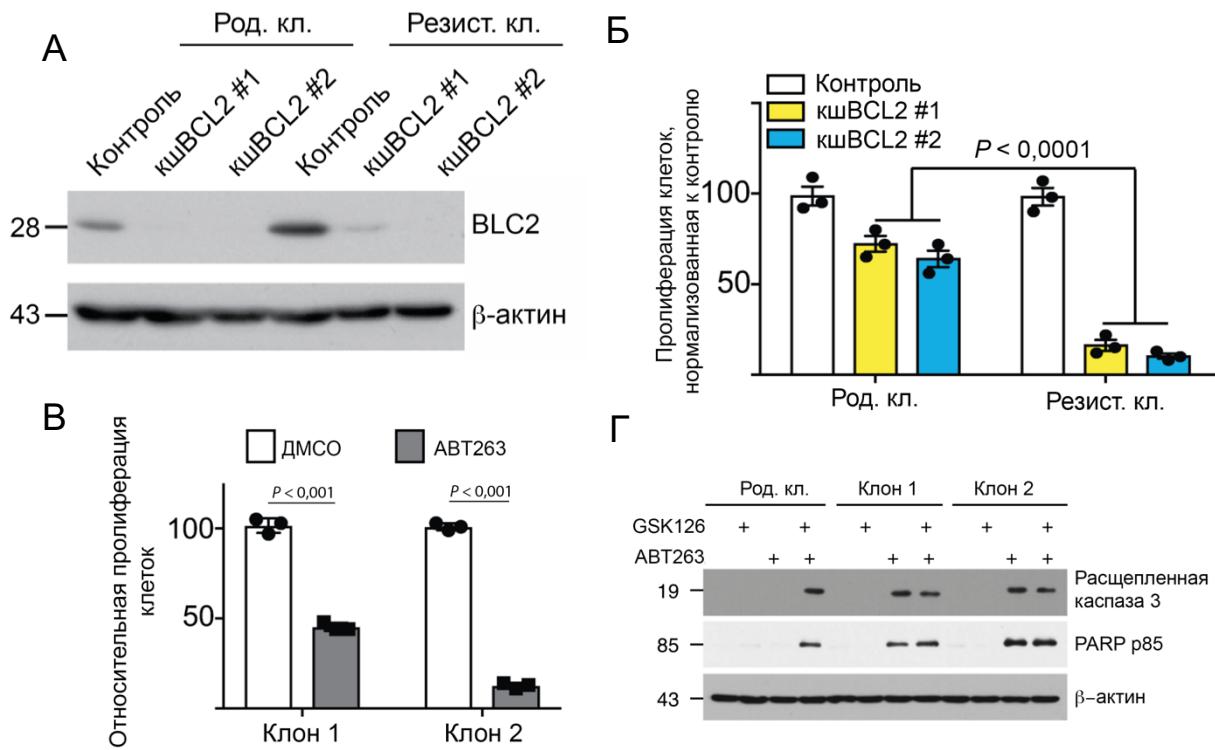


Рисунок 7 – А: Анализ уровня экспрессии BCL2 после нокдауна с использованием кшРНК; Б: Анализ пролиферации клеток после нокдауна BCL2; В: Анализ чувствительности резистентных клеток к ингибитору BCL2 – ABT263; Г: Вестерн-блот анализ уровня β -актина и маркеров апоптоза расщепленной каспазы 3 и PARP p85 после обработки клеток TOV21G ингибиторами GSK126 и/или ABT263 (ДМСО использовали в качестве контроля)

Таким образом, было показано, что клетки, резистентные к ингибиторам EZH2, зависят от функциональной активности белка BCL2.

Определение эффективности ингибиования BCL2 *in vivo* на моделях светлоклеточной карциномы яичника, резистентных к ингибиторам EZH2

Для подтверждения полученных результатов *in vivo*, мы имплантировали клетки TOV21G, резистентные к ингибиторам EZH2, в яичниковую сумку иммунодефицитных мышей линии NOD.Cg-*Prkdc*^{scid} *Il2rg*^{tm1Wjl}/SzJ (NSG) и

подвергли лечению в течение трех недель с использованием GSK126 (50мг/кг, интраперитонеально, ежедневно) или ABT263 (50мг/кг интраперитонеально, ежедневно), контрольная группа получала раствор натрий-fosфатного буфера. Ортоптические опухоли были резистентны к ингибитору EZH2 (Рис. 8А). Стоит отметить, что применение ABT263 было достаточно, чтобы вызвать регрессию данных опухолей, что коррелировало с увеличенной продолжительностью жизни мышей, несущих ортоптические опухоли. 50% выживаемость составила 45 дней в контрольной группе, и 44 дня в группе, получавшей GSK126, и 56 дней в группе, получившей ABT263 (Рис. 8Б).

Следовательно, мы показали, что использование ингибитора BCL2 – ABT263 на моделях СКЯ с мутацией в гене *ARID1A*, резистентных к ингибиторам EZH2, приводит к регрессии резистентных СКЯ и улучшает выживаемость мышей, несущих опухоли, вызывая апоптоз и уменьшая пролиферацию опухолевых клеток *in vivo*.

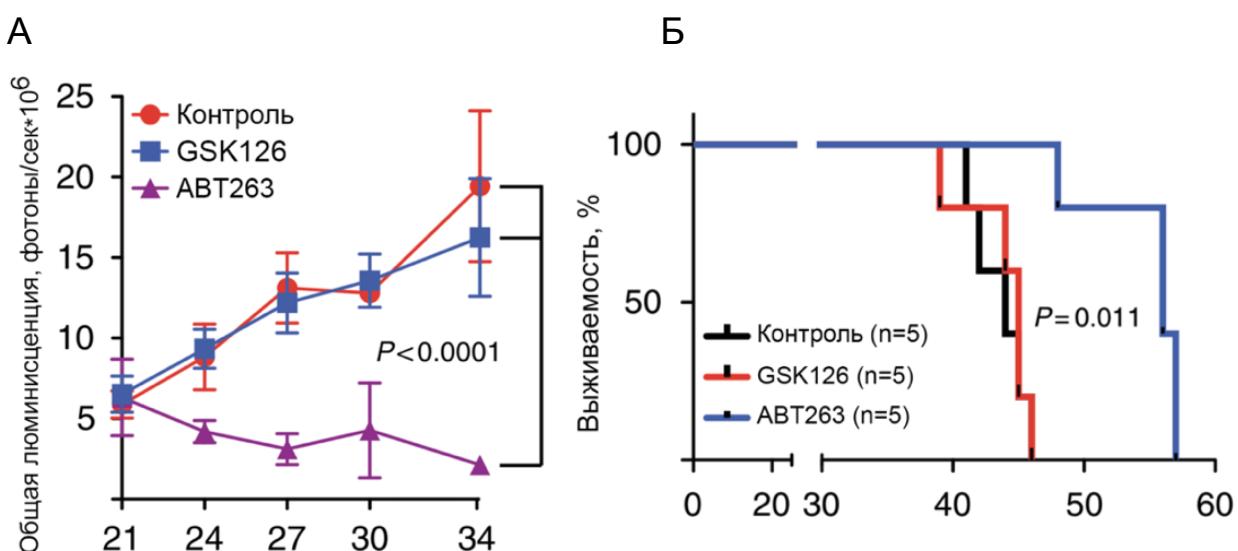


Рисунок 8 – А: Уровень люциферазы опухолей, образованных резистентными клетками TOV21G в мышах, получавших ингибиторы GSK126 или ABT263. Б: Кривые Каплана-Майера для (А)

Таким образом, была продемонстрирована целесообразность применения ингибитора ABT263 для терапии опухолей с мутацией в гене *ARID1A*, резистентных к ингибиторам EZH2.

Определение эффективности комбинации ингибиторов ABT263 и GSK126 на клетках светлоклеточной карциномы яичника с мутацией в гене ARID1A

Поскольку ингибитор BCL2 – ABT263 эффективен в подавлении роста резистентных опухолей, было решено проверить комбинацию ингибиторов ABT263 и GSK126 при СКЯ с мутацией в гене *ARID1A*. Для этого был проведен анализ взаимодействия данных ингибиторов на клеточных линиях СКЯ с мутацией в гене *ARID1A*. Клетки TOV21G были культивированы в течение 7 дней в присутствии возрастающих доз ABT263 (1,2 мкмоль-3,4 мкмоль), GSK126 (0,5-4 мкмоль) и обоих ингибиторов. Интересно, что клетки с мутацией в гене *ARID1A* TOV21G были чувствительны к комбинации использованных ингибиторов и имели низкий комбинационный индекс, рассчитанный на программе CompuSyn (Рис. 9А). Для подтверждения полученных результатов *in vivo* мы ввели клетки линии первичной опухоли XVOA295 под кожу мышей линии NSG и подвергли лечению в течение 21 дня ингибитором GSK126 (50мг/кг, интраперитонеально, ежедневно), ABT263 (50мг/кг интраперитонеально, ежедневно), или комбинации указанных препаратов. Контрольная группа получала раствор НФБ. Опухоли, сформированные клетками XVOA295, были чувствительны как к ингибированию EZH2, так и к ингибированию BCL2.

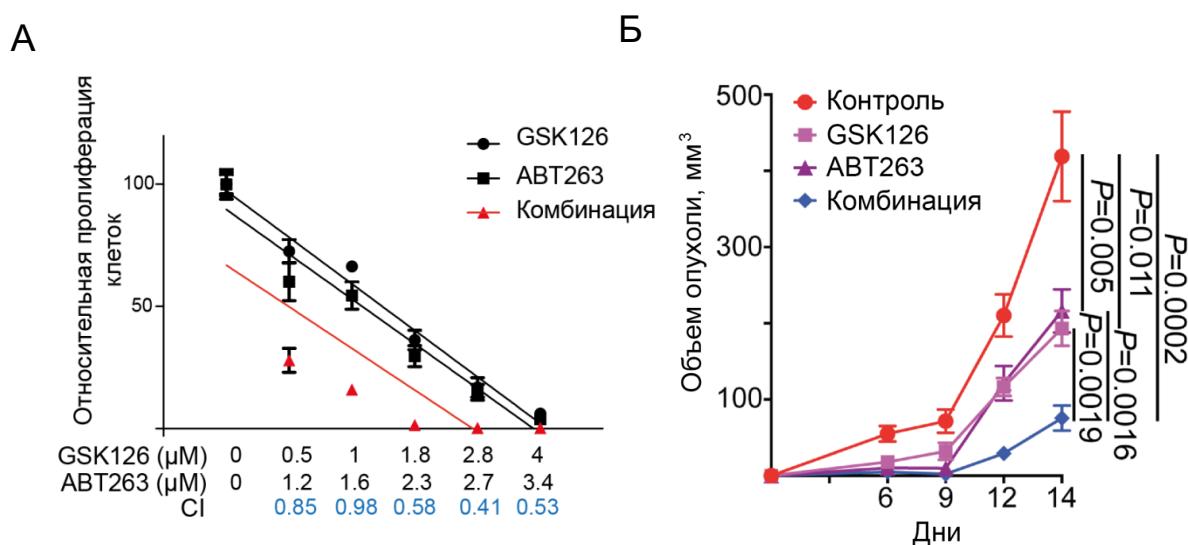


Рисунок 9 – А: Анализ синергического взаимодействия GSK126 и ABT263 в клеточной линии СКЯ с мутацией в гене *ARID1A* TOV21G; Б: График роста опухолей первичной клеточной линии XVOA295 в контрольной группе и в мышах, получавших указанные ингибиторы (ABT263, 50мк/кг; GSK126, 50 мг/кг; и их комбинацию в указанных

Применение комбинации препаратов привело к большему подавлению роста опухолей, чем использование какого-либо отдельного ингибитора (Рис. 9Б).

Таким образом, мы показали, что клетки СКЯ с мутацией в гене *ARID1A* чувствительны к ингибированию BCL2 и EZH2, и предложили комбинацию ингибиторов GSK126 и ABT263 для таргетной терапии данного подтипа ЭРЯ. Использование комбинации указанных ингибиторов не только оказывает синергический эффект на рост опухолей, но и подавляет рост клеток, резистентных к ингибиторам EZH2.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, мы выяснили, что снижение экспрессии SMARCA4 в клетках СКЯ с мутацией в гене *ARID1A* ведет к увеличению экспрессии SMARCA2 и сопровождается приобретённой резистентностью к ингибиторам EZH2. Кроме того, мы идентифицировали супрессор апоптоза BCL2 в качестве мишени для фармакологического воздействия на резистентные клетки и показали, что резистентные клетки чувствительны к ингибитору BCL2 – ABT263. Вдобавок, мы продемонстрировали, что ABT263 и ингибитор EZH2 – GSK126 синергично взаимодействуют на моделях СКЯ с мутацией в гене *ARID1A*. Учитывая, что, как ингибиторы BCL2, так и ингибиторы EZH2 в данный момент проходят клинические испытания, наши результаты важны для разработки стратегий лечения опухолей светлоклеточной карциномы яичника с мутацией в гене *ARID1A*. Результаты диссертационного исследования позволили выявить молекулярные механизмы резистентности к ингибиторам EZH2 при СКЯ с мутацией в гене *ARID1A* и определить эффективные методы преодоления этой резистентности. Кроме того, была предложена перспективная комбинация ингибиторов GSK126 и ABT263 для таргетной терапии светлоклеточной карциномы яичника с мутацией в гене *ARID1A*.

ВЫВОДЫ

1. Получена клеточная линия светлоклеточной карциномы яичника с мутацией в гене *ARID1A*, резистентная к ингибиторам метилтрансферазы EZH2.
2. В резистентных клеточных линиях светлоклеточной карциномы яичника с мутацией в гене *ARID1A* обнаружено изменение представленности каталитических субъединиц комплекса SWI/SNF, при котором происходит увеличение экспрессии гена *SMARCA2* и уменьшение экспрессии гена *SMARCA4*.

3. Установлено, что изменение уровня экспрессии гена *SMARCA4* комплекса SWI/SNF отвечает за резистентность к ингибиторам EZH2 при светлоклеточной карциноме яичника с мутацией в гене *ARID1A*.

4. BCL2 идентифицирован и охарактеризован в качестве мишени для фармакологического воздействия при светлоклеточной карциноме яичника, резистентной к ингибиторам EZH2.

5. Показано, что комбинация ингибиторов GSK126 и ABT263 синергически подавляют рост светлоклеточной карциномы яичника с мутацией в гене *ARID1A*.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в научных журналах:

1. Wu S., **Fatkhutdinov N.** [и др.]. SWI/SNF catalytic subunits' switch drives resistance to EZH2 inhibitors in ARID1A-mutated cells. / S. Wu, N. Fatkhutdinov, T. Fukumoto, B.G. Bitler, P.H. Park, A. V Kossenkov, M. Trizzino, H.-Y. Tang, L. Zhang, A. Gardini, D.W. Speicher, R. Zhang, // Nature communications. 2018. № 1 (9). C. 4116.-4125.

2. **Фатхутдинов Н.Р.**, Чжан, Р., Киямова Р.Г. Роль композиции ремоделера хроматина SWI/SNF в чувствительности к ингибиторам GSK126 и ABT263. // Молекулярная медицина. 2020 №1 (18) С. 31-35.

3. Fukumoto T. [и др.]. Repurposing pan-HDAC inhibitors for ARID1A-mutated ovarian cancer / T. Fukumoto, P.H. Park, S. Wu, **N. Fatkhutdinov**, S. Karakashev, T. Nacarelli, A. V Kossenkov, D.W. Speicher, S. Jean, L. Zhang, // Cell reports. 2018. № 13 (22). C. 3393–3400.

4. Bitler B.G., **Fatkhutdinov N.**, Zhang R. Potential therapeutic targets in ARID1A-mutated cancers. / B.G. Bitler, N. Fatkhutdinov, R. Zhang, // Expert opinion on therapeutic targets. 2015. № 11 (19). C. 1419–1422.

5. Wu S., **Fatkhutdinov N.**, Zhang R. Harnessing mutual exclusivity between TP53 and ARID1A mutations. // Cell cycle, 2017. C. 2313-2314.

Тезисы конференций:

Wu S., [и др.]. Catalytic subunits switch drives resistance to EZH2 inhibitors in arid1a-mutated cells. / S. Wu, **N. Fatkhutdinov**, T. Fukumoto, B.G. Bitler, P.H. Park, A. V Kossenkov, M., A. Gardini, D.W. Speicher, R. Zhang, // Clinical cancer research. 2019. № 22-Supplement (25). C. 116-117.