

На правах рукописи

СТЕПАНОВА ДИНА СЕРГЕЕВНА
**ПОИСК ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ ДЛЯ ТЕРАПИИ
НЕЙРОФИБРОМАТОЗА II ТИПА**

14.03.06 – фармакология, клиническая фармакология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

МОСКВА – 2015

Работа выполнена в Государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

Доктор медицинских наук,

Николай Львович Шимановский

Официальные оппоненты:

Доктор медицинских наук, профессор
ФГБОУ ДПО «Институт повышения квалификации»

Николай Владимирович Образцов

ФМБА, профессор кафедры токсикологии и клинической фармакологии

Доктор медицинских наук, доцент
ГБОУ ВПО «Первый московский государственный
медицинский университет им. И.М. Сеченова»,
профессор кафедры фармакологии фармацевтического факультета

Юрий Кузьмич Наполов

Ведущая организация:

Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «___» июня 2015 года в «___» часов на заседании
Диссертационного совета Д 208.072.01 при ГБОУ ВПО «Российский национальный
исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Министерства
здравоохранения Российской Федерации по адресу: 117997, г. Москва, ул. Островитянова д. 1.

С диссертацией можно ознакомиться в фундаментальной библиотеке ГБОУ ВПО
«Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова»
Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 117998, Москва, ул.
Островитянова, д. 1.

Автореферат разослан «___» апреля 2015 года.

Ученый секретарь диссертационного совета

доктор медицинских наук, профессор

А.С. Духанин

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и новизна работы

Нейрофиброматоз второго типа (НФ II) – аутосомно-доминантное наследственное заболевание, характеризующееся образованием множественных доброкачественных опухолей, преимущественно шванном и менингиом, локализующихся в центральной нервной системе и по ходу периферических нервов (Evans, D.G., et al., 1992). Лечение сводится к многократным хирургическим вмешательствам, и пациенты редко доживают до тридцати лет.

Развитие заболевания связано с повреждением гена *NF2* (Evans, D.G., et al., 1992, Bianchi, A.V., et al., 1994). С мутациями в этом гене связано как образование спорадических шванном и менингиом по всему телу, так и развитие опухолей, на первый взгляд не связанных с нейрофиброматозом, например, злокачественных мезотелиом. До сих пор неизвестно, каким образом регулируется активность продукта гена *NF2*, белка мерлин, и не установлены посредники, отвечающие за его онкосупрессорную функцию.

Поскольку до сих пор не существует фармакотерапии нейрофиброматоза II, многократные хирургические вмешательства снижают качество и продолжительность жизни пациентов, а генной терапии данного заболевания не существует в связи с невозможностью равномерного распределения недостающего онкосупрессора мерлина в тканях пациента, поиск лекарственных веществ (ЛВ) для лечения НФ II является чрезвычайно актуальной задачей. Традиционный подход к решению этой задачи заключался в испытании зарегистрированных противоопухолевых препаратов на пациентах с НФ II и пока не привел к положительным результатам (Plotkin, S.R., et al., 2008 и 2009). Было опробовано качественно иное решение задачи, а именно, проведён скрининг панели биологически-активных соединений, относящихся к различным классам ЛВ, с использованием клеточной модели нейрофиброматоза II типа.

Цель исследования

Целью данной работы является поиск кандидатов для фармакотерапии нейрофиброматоза второго типа при помощи химического скрининга.

Задачи:

1) Модифицировать имеющуюся клеточную линию с высоким уровнем экспрессии гена *Nf2*, добиваясь нокаута *Nf2*.

2) Охарактеризовать полученную линию и сравнить ее с исходной – изогенной – линией, используя следующие критерии:

- a морфологию
- b кривые роста
- c устойчивость клеток к истощению среды
- d устойчивость клеток к действию цитотоксических агентов.

3) Сравнить действие некоторых известных биологически активных молекул на изогенные *Nf2*-отрицательные и *Nf2*-положительные линии с целью определения веществ, избирательно действующих на *Nf2*^{-/-} клетки с помощью химического скрининга.

a провести скрининг коллекции низкомолекулярных биоактивных соединений (оценить соотношение выживаемости *Nf2*-отрицательных и *Nf2*-положительных клеток в присутствии исследуемых соединений)

b валидировать результаты скрининга:

- построить кривые концентрация/эффект для отобранных в скрининге соединений
- протестировать соединения-кандидаты на различных *Nf2*-отрицательных линиях
- оценить влияние реэкспрессии белка мерлин в *Nf2*-отрицательных клетках на эффект исследуемых веществ.
- протестировать фармакологические аналоги веществ, отобранных по результатам скрининга.

4) Определить механизм действия веществ-кандидатов, найденных в результате скрининга.

5) Проверить эффективность отобранных кандидатов *in vivo*.

Научная новизна работы

Работа содержит новые данные о ЛВ, проявляющих избирательность в отношении *Nf2*-отрицательных клеток. Показана селективность ингибитора 3-гидроксиметилглутарил-коА редуктазы ловастатина и ингибитора синтазы жирных кислот церуленина в отношении *Nf2*-отрицательных клеток и описан механизм селективности действия данных соединений. Работа содержит новые данные о роли активации цитоплазматической фракции малой ГТФазы Rac1 в запуске клеточной гибели. Ранее были подробно описаны функции мембранной фракции Rac1, играющей важную роль в направленном движении клетки. Однако есть лишь одна статья (Liang, S.L., et al., 2006), демонстрирующая роль активированной Rac1 в цитоплазме. В данной работе показано, что гиполипидемические препараты группы статинов, вызывая истощение внутриклеточного пула геранил-гераниола, переводят Rac1 из мембранной фракции в цитоплазматическую, а также, селективно активируют Rac1 в *Nf2*-отрицательных клетках, вызывая их гибель. Впервые описан синергизм между статинами и ингибитором геранилтрансферазы I. Работа содержит данные о роли белка мерлин в регуляции метаболизма жирных кислот. В данной работе были обнаружены особенности метаболического сдвига в *Nf2*-отрицательных клетках и доказано, что благодаря этим особенностям ингибиторы синтазы жирных кислот, в частности, церуленин, обладают селективностью в отношении *Nf2*-отрицательных клеток.

На основании полученных результатов впервые предложены два возможных подхода к терапевтическому лечению НФ II: ингибирование 3-гидрокси-3-метилглутарил-коА редуктазы и геранилтрансферазы I и ингибирование синтазы жирных кислот.

Практическая значимость диссертации

При отсутствии терапевтических средств для лечения НФ II в настоящее время активно ведется поиск и изучение ферментных каскадов, которые могут быть нарушены в результате утраты мерлина. В данной работе были обнаружены существенные изменения метаболического профиля *Nf2*-отрицательных клеток, а также, доказана необходимость нормального геранилирования ГТФазы Ras1 для выживания *Nf2*-отрицательных клеток. Таким образом, результаты работы позволяют рассматривать ингибиторы геранилтрансферазы I, 3-гидрокси-3-метилглутарил-коА редуктазы и синтазы жирных кислот в качестве новых потенциальных терапевтических агентов в лечении НФ II.

Внедрение результатов исследования

Результаты исследований и ряд примененных в работе методов применяются в исследованиях в Фокс-Чейзовском Онкологическом Центре (Филадельфия, США) и внедрены в учебный процесс на кафедре радиобиологии и молекулярной биологии ГБОУ ВПО РНИМУ им. Пирогова Минздрава России.

Апробация результатов диссертационной работы

Результаты работы были представлены на международных конференциях: “Cell Symposia: Systems Approach to Metabolic Diseases” (Чикаго, США, 2014), “The NF Conference 2013” (Монтеррей Бэй, США, 2013), “18th Annual Postdoctoral and Graduate Student Conference” (Филадельфия, США, 2013), “The NF Conference 2011” (Джексон Хол, США 2011), “16th Annual Postdoctoral and Graduate Student Conference” (Филадельфия, США, 2011)

Публикации

По теме диссертации опубликовано 7 печатных работ.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 129 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов исследований и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы, включающего 139 источников, из которых 137 зарубежных. Работа содержит 49 рисунков.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали мышинные эмбриональные фибробласты, несущие флокс-аллель в гене *Nf2* (MEF *Nf2^{lox/lox}*), иммортализованные клетки мышинной *Nf2*-отрицательной шванномы (SC4-9), иммортализованные мышинные шванновские клетки FC912 (дикого типа) и FH912 (*Nf2*-отрицательные) – любезно предоставлены д-ром Марко Джованнини (dr Marco Giovannini, Centre d'Etude du Polymorphisme Humain (CEPH) et Institut Universitaire d'Hematologie, Paris, France); и клетки линии крысиной *Nf2*-отрицательной шванномы (RT4) – получены из Американского банка клеток и тканей (ATCC, кат. № CRL-2768).

Все клетки, кроме FC912 и FH912, выращивали в модифицированной по Дульбекко среде Игла (DMEM) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС), 2 мМ L-глутамина, 1мМ пирувата натрия и 0.1 м М смеси заменимых аминокислот (все Gibco Invitrogen Ltd, Paisley, UK) при 37⁰С, 5% CO₂. Клетки линий FC912 и FH912 выращивали в среде DMEM:F12 (1:1) с добавлением 2 мкМ форсколина, 10 нг/мл нейрегулина и добавки N2 в рекомендованной производителем концентрации на чашках, обработанных полилизинном и ламинином.

Получение фибробластов, нокаутных по гену *Nf2*. Иммортализованные клетки MEF *Nf2^{lox/lox}* трансфецировали плазмидным вектором pMSCV-Cre-GFP, несущим Cre-рекомбиназу и зеленый флуоресцентный белок (GFP). Контрольные клетки MEF *Nf2^{lox/lox}* трансфецировали плазмидным вектором pMSCV-GFP, несущим только GFP. Через 48 часов после трансфекции на проточном цитофлуориметре (Becton Dickinson FACS-VantageSE flow cytometer) отбирали флуоресцентные клетки. Делеция гена *Nf2* была подтверждена геномным типированием и иммуноблоттингом.

Скрининг коллекции низкомолекулярных биоактивных веществ. В работе использована коллекция биологически активных веществ ICCB Known Bioactives (Enzo Life Sciences, США, № [BML-2840-0100](#)). Скрининг был осуществлён на двух клеточных линиях: экспериментальной MEF $Nf2^{-/-}$ и контрольной MEF $Nf2^{lox/lox}$, в триплетах, и повторён дважды. В качестве отрицательного контроля использовали растворитель (ДМСО). В качестве положительного контроля использовали стауроспорин в конечной концентрации 20 мкМ. Действие веществ оценивали по уровню выживаемости клеток, измеренному с помощью модифицированного МТТ-теста. Веществами, показавшими положительный результат, считали такие, для которых соотношение жизнеспособных клеток MEF $Nf2^{-/-}$ к MEF $Nf2^{lox/lox}$ было $< 0,8$, расценивая разницу в 20% как умеренные различия, а ожидаемая доля ложных отклонений гипотез (FDR, false discovery rate) по методу Бенджамини-Хохберга [Y. Benjamini и Y. Hochberg, 1995] $< 20\%$. При валидации результатов скрининга клетки выращивали в 96-луночных планшетах. Среднюю ингибиторную концентрацию (IC_{50} , концентрацию вещества, при которой доля жизнеспособных клеток составляла 50%) рассчитывали по формуле $IC_{50}=a+b*\arctg(1-1/2c)$ после аппроксимации кривой Доза/Эффект логистической функцией $y=c*(1-tg((x-a)/b))$, где x – концентрация вещества, методом наименьших квадратов по коэффициентам a , b и c .

Активность малой ГТФазы Rac1 оценивалась методом резонансного переноса энергии флуоресценции (FRET) (L. Hodgson, F. Shen, K. Hahn, 2010).

Уровень синтеза жирных кислот оценивался с помощью иммуноблоттинга с антителами против ферментов, участвующих в липогенезе (синтаза жирных кислот (Fasn), ацетил-коА карбоксилаза (Acc), фосфо-ацетил-коА карбоксилаза (фAcc), фактор транскрипции липин 1 (Lipin1), АТФ-цитратлиаза (Acl), фосфо-АТФ-цитратлиаза (фAcl), ацетил-коА синтетаза (Acecs1), лигаза длинноцепочечных жирных ацил-коА (long fatty acid acyl-coA

ligase *Acs11*), нормализуя результаты к уровню экспрессии β -актина, и с помощью количественной ПЦР с праймерами генов *Fasn*, *Acaca* (ген *Acc1*), *Acacb* (ген *Acc2*), *Lpin1*, *Acly*, *Acss2* (ген *Acscs1*), *Acs11*, *Srbp1* (ген стерольного регуляторного элемента 1, фактора транскрипции), *Cpt1c* (ген карнитинпальмитоилтрансферазы I γ) и *Cpt2* (ген карнитинпальмитоилтрансферазы II), нормализуя результаты к усреднённому уровню экспрессии генов «домашнего хозяйства» *Actinb*, *Tbp1* и *Hrpt*.

Накопление промежуточных продуктов синтеза жирных кислот (ацетил-коА и малонил-коА) оценивали с помощью ультравысокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией (УВЭЖХ/МС) с предварительной твердофазной очисткой клеточных экстрактов.

Статистический анализ. Все эксперименты повторяли в триплетах по 4 раза. Для построения графиков и таблиц использовали средние значения и доверительный интервал для вероятности $P=95\%$. Статистическую значимость результатов p оценивали с помощью двухвыборочного t -критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Получение фибробластов, нокаутных по гену *Nf2*

В работе использовали мышинные эмбриональные фибробласты (MEF), так как в норме в этих клетках наблюдается выраженная экспрессия гена *Nf2*, и имеются литературные данные, подтверждающие, что потеря данного гена оказывает значительный эффект на фенотип этих клеток (Morrison, H. Et al., 2001, Lallemand, D., et al., 2003).

Первичные культуры мышинных эмбриональных фибробластов (MEF *Nf2^{flox/flox}*) были иммортализованы и обработаны Cre-рекомбиназой (описано в разделе «Материалы и методы»)

Для подтверждения нокаута гена *Nf2* в клетках MEF *Nf2^{-/-}* было проведено генотипирование полученных линий и вестерн-блоттинг лизатов клеток. Данные исследования подтвердили нокаут гена *Nf2*.

Были исследованы изменения функциональных свойств, вызванные нокаутом гена *Nf2*. Полученная линия отличалась от контрольной морфологически – клетки выглядели более распластанными, склонными к образованию ламеллиподий, склонными к отделению от субстрата; более высокой скоростью роста; большей устойчивостью к истощению среды и к воздействию цитотоксических агентов (стауроспорина). Также, в клетках полученной *Nf2*-отрицательной линии были проанализированы изменения уровня экспрессии и фосфорилирования некоторых белков, в норме взаимодействующих с мерлином. Результаты иммуноблоттинга свидетельствуют об активации пролиферативных и антиапоптотических каскадов в клетках линии MEF *Nf2^{-/-}*.

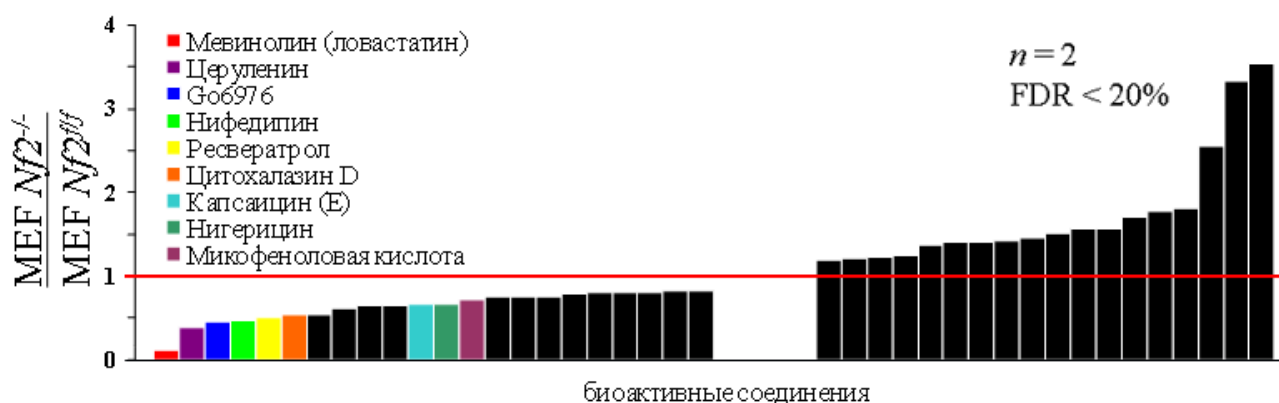
В данной работе получены две линии клеток, отличающихся только по одному гену *Nf2*, что может стать мощным инструментом для изучения взаимодействий мерлина, а также для поиска лекарственной терапии НФ II.

Скрининг коллекции низкомолекулярных биоактивных веществ

Скрининг провели на клетках полученных линий MEF *Nf2^{-/-}* и MEF *Nf2^{flox/flox}*, чтобы оценить избирательную токсичность соединений в отношении *Nf2*-

отрицательных клеток. На рис. 1 представлены первичные результаты скрининга, и цветом выделены вещества, удовлетворяющие критериям отбора (соотношение жизнеспособных клеток MEF $Nf2^{-/-}$ к MEF $Nf2^{lox/lox} < 0,8$; FDR по методу Бенджамини-Хохберга $< 20\%$).

Рисунок 1. «Первичные результаты скрининга коллекции низкомолекулярных биоактивных соединений»



9 веществ, соответствовавших критериям отбора скрининга (соотношение жизнеспособных $Nf2$ -отрицательных клеток к жизнеспособным контрольным $< 0,8$; FDR $< 20\%$) были выбраны для следующего этапа исследований.

Первичная валидация результатов скрининга

Изучение зависимости цитотоксического эффекта исследуемых соединений от их концентрации и тестирование соединений-кандидатов на клетках $Nf2$ -отрицательных линий

Для кандидатов, идентифицированных с помощью скрининга, были исследованы зависимости цитотоксичности от концентрации для обеих клеточных линий. Соединения были протестированы на клетках других $Nf2$ -отрицательных линий (SC4-9 и RT4). На следующем этапе был изучен эффект фармакологических аналогов исследуемых соединений, а также, чтобы подтвердить, что селективная токсичность выбранных веществ обусловлена отсутствием белка мерлин в клетках $Nf2$ -отрицательных линий, в клетках линии

SC4-9 резэкспрессировали белок мерлин и снова протестировали исследуемые соединения.

По результатам валидации, из девяти соединений, удовлетворявших критериям отбора скрининга, для дальнейших исследований были выбраны два – ингибитор 3-гидрокси-3-метилглутарил-коА редуктазы ловастатин и ингибитор синтазы жирных кислот церуленин.

Исследование механизма действия статинов в отношении *Nf2*-отрицательных клеток

Ловастатин является ингибитором 3-гидрокси-3-метилглутарил-коА редуктазы, фермента, который осуществляет синтез холестерина из мевалоната. Статины блокируют первую стадию синтеза – превращение ацетил-коА в мевалонат. Чтобы выяснить, какой из этапов синтеза является ключевым для жизнедеятельности *Nf2*-отрицательных клеток, в среду совместно с ловастатином добавляли холестерол или промежуточные продукты. Холестерол не влиял на токсичность статинов, однако фарнезилфосфат и геранилгераниолфосфат полностью подавляли действие статинов.

Геранилгераниолфосфат и фарнезилфосфат необходимы для пренилирования и заякоривания на мембране некоторых белков. Поскольку геранилгераниолфосфат может быть синтезирован в клетке из фарнезилфосфата, были использованы различные ингибиторы фарнезилтрансфераз и геранилтрансфераз, чтобы выяснить, какой из процессов определяет селективную токсичность статинов. Только ингибиторы геранилтрансферазы обладали селективной токсичностью в отношении *Nf2*-отрицательных клеток.

Одной из основных групп геранилируемых белков являются малые ГТФазы семейства Ras. Химическое и генетическое повышение активности Ras привело к потенцированию эффекта статинов, в особенности, в *Nf2*-положительных клетках.

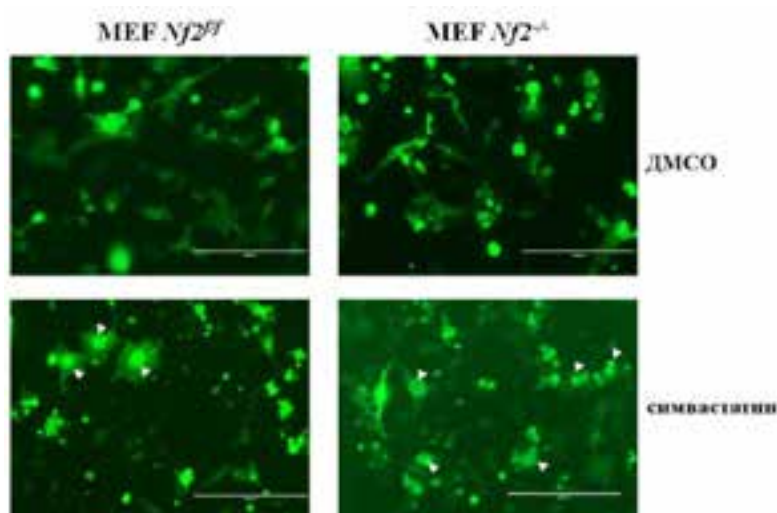
Поскольку известно, что мерлин является ингибитором Ras, и в *Nf2*-отрицательных клетках наблюдается их патологическая активация, можно

предположить, что нарушение геранилирования и, следовательно, закоривания активированной Ras на мембране вызывает клеточную гибель.

Выключение гена *Rac1*, как и следовало ожидать, приводило к подавлению токсичности симвастатина. Выключение генов других ГТФаз семейства Ras не давало столь выраженного эффекта антагонизма.

С помощью флуоресцентной микроскопии было установлено, что под действием статинов происходит транслокация *Rac1* в ядро. Клетки линий MEF *Nf2^{-/-}* и MEF *Nf2^{fl/fl}* трансфецировали плазмидным вектором, кодирующим фьюжн-белок *Rac1*-GFP, и через 24 часа после трансфекции добавили в среду симвастатин. Через час инкубации с симвастатином в большинстве клеток линии MEF *Nf2^{-/-}* *Rac1* визуализировалась преимущественно в ядре. Тем не менее, через 24 часа транслокация наблюдалась уже в обеих клеточных линиях (рис. 2)

Рисунок 2. «Транслокация *Rac1* в ядро в отсутствие геранилирования»

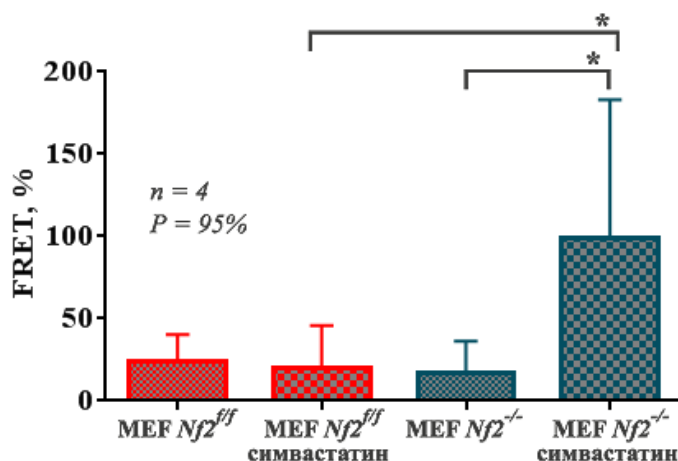


Активность *Rac1* в ядре была измерена с помощью флуоресцентного резонансного переноса энергии (FRET) (рис. 11). Для этого клетки линий MEF *Nf2^{-/-}* и MEF *Nf2^{fl/fl}* трансфецировали плазмидными векторами, кодирующими сенсоры активности *Rac1*: белок-фьюжн *Rac1*-CFP и белок-фьюжн *Pid*-YFP, являющийся субстратом *Rac1*. Исследование показало, что в клетках линии MEF *Nf2^{-/-}* *Rac1* под действием статинов активируется (рис. 3)

Таким образом, статины вызывают истощение внутриклеточного пула геранилгераниола, приводящее к нарушению геранилирования малых ГТФаз, в

частности *Rac1*. Под действием статинов *Rac1* разякоривается, отсоединяется от клеточной мембраны и транслоцируется в ядро. В *Nf2*-отрицательных клетках разякоренная *Rac1* активируется и вызывает клеточную гибель.

Рисунок 3. «Измерение активности ядерной *Rac1* с помощью флуоресцентного резонансного переноса энергии»



Цитоплазматические и ядерные функции *Rac1* до сих пор не были описаны и подлежат дальнейшему изучению.

Исследование механизма противонейрофиброматозного действия церуленина

Церуленин – второе по эффективности соединение, прошедшее валидацию – является ингибитором синтазы жирных кислот. Поскольку фармакологические аналоги церуленина обладают селективной токсичностью в отношении *Nf2*-отрицательных клеток, можно предположить, что этот фермент имеет большое значение для клеток опухолей, развивающихся в результате утраты гена *Nf2*. Был проведён ряд экспериментов, чтобы установить причину, по которой нормальное функционирование *Fasn* особенно важно именно для *Nf2*-отрицательных клеток.

Наряду с химическим ингибированием *Fasn* были применены малые интерферирующие РНК против гена синтазы жирных кислот *Fasn*. Клетки линий MEF *Nf2*^{-/-} и MEF *Nf2*^{lox/lox} трансфицировали шпилечной РНК против гена *Fasn* в плазмидном векторе pGFP-V-RS. Через 24 часа после трансфекции в чашках с клетками MEF *Nf2*^{-/-}, трансфицированными РНК против гена *Fasn*, наблюдались округлившиеся всплывшие клетки, подвергшиеся апоптозу. В чашках с клетками

MEF *Nf2^{-/-}*, трансфицированными контрольной РНК, а также в чашках с клетками MEF *Nf2^{ff}* клеточной гибели не наблюдалось.

Для количественной оценки апоптоза, вызванного выключением гена *Fasn*, а также для сравнения действия церуленина с эффектом нокдауна *Fasn*, был выполнен иммуноблоттинг с антителами против эффекторной каспазы 3, которая является надёжным индикатором апоптоза. Были исследованы 6 групп образцов: клетки линий MEF *Nf2^{-/-}* и MEF *Nf2^{lox/lox}*, трансфицированные шпилечной РНК против гена *Fasn*, клетки, трансфицированные контрольной РНК, и клетки, трансфицированные контрольной РНК и инкубированные с 10µМ церуленином в течение 12 часов. Значительное повышение уровня апоптоза наблюдалось только в лизатах клеток MEF *Nf2^{-/-}*, трансфицированных шпилечной РНК против гена *Fasn*, и MEF *Nf2^{-/-}*, подвергнутых действию церуленина. Ещё одним отличием *Nf2*-отрицательных клеток от контрольных оказалось снижение уровня экспрессии *Fasn* под действием церуленина, которое наблюдалось только в клетках линии MEF *Nf2^{-/-}*.

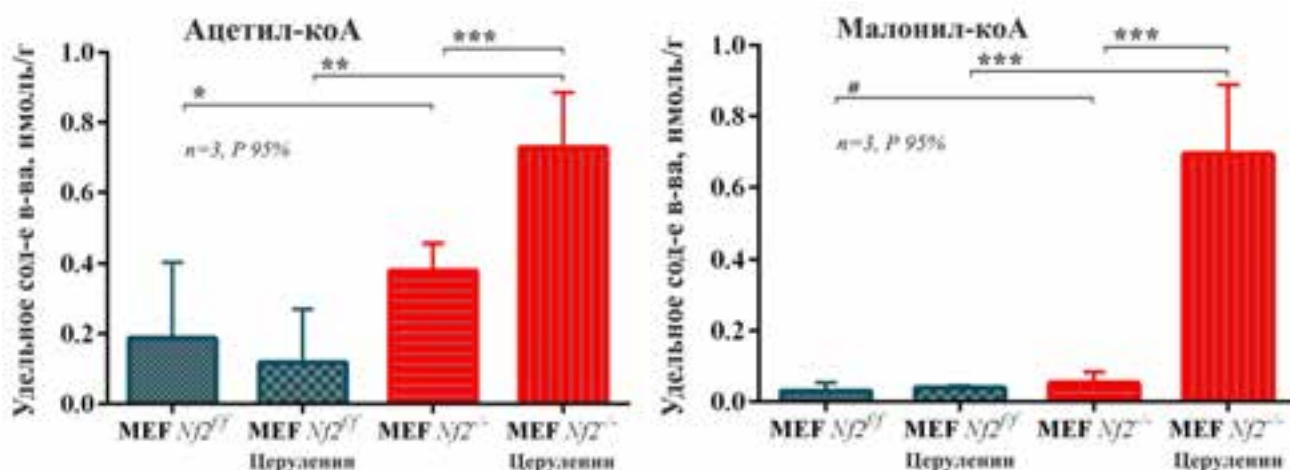
Эксперименты с химическим ингибированием и генетическим выключением синтазы жирных кислот доказали, что селективность церуленина связана с его прямым механизмом действия и обусловлена зависимостью *Nf2*-отрицательных клеток от нормального функционирования *Fasn*.

Поскольку для каждой из протестированных клеточных линий (MEF *Nf2^{-/-}*, MEF *Nf2^{ff}*, SC4-9 и RT4) IC₅₀ церуленина в бессывороточной и полной среде не отличалась, а добавление 5 µМ пальмитата не уменьшало токсичности церуленина, мы сделали вывод, что апоптоз, вызываемый данным соединением, не обусловлен дефицитом жирных кислот. В то же время, известно, что церуленин блокирует раннюю стадию синтеза жирных кислот – конденсацию малонил-коА (Price A.C. *et al.*, 2001), – что приводит к накоплению в клетках малоната. Малонил-коА, утилизируемый синтазой жирных кислот, синтезируется из ацетил-коА ферментом ацетил-коА карбоксилазой (Асс). Чтобы убедиться, что в данном случае механизм действия церуленина не отличается от уже описанного, мы проверили действие церуленина на клетках с выключенным геном ацетил-коА

карбоксилазы (*Acasa*). Клетки линий MEF *Nf2^{-/-}* и MEF *Nf2^{fl/fl}* трансфецировали миРНК против гена *Acasa* и сравнили действие церуленина на клетки с выключенным геном *Acasa* и клетки, трансфецированные контрольной миРНК. Химическое ингибирование Асс 5-тетрадецилокси-2-фуроевой кислотой (ТОФК) также повышало IC₅₀ церуленина. Активация Асс 5-йодотуберцидином, наоборот, делала клетки более чувствительными к церуленину. Примечательно, что эффект ТОФК был более заметен на клетках MEF *Nf2^{-/-}*, а действие 5-йодотуберцидина, наоборот, сильнее проявляется на MEF *Nf2^{fl/fl}*.

Подавление конденсации малонила, опосредованное церуленином, приводит к повышению внутриклеточного уровня малоната, токсичного для клеток. Поскольку конденсация блокируется в любых типах клеток, разница в чувствительности к церуленину может объясняться различием в уровне синтеза жирных кислот. Для подтверждения гипотезы о различных уровнях метаболизма в опухолевых и нормальных клетках, мы измерили с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией (ВЭЖХ/МС) уровни ацетил-коА и малонил-коА в клетках линий MEF *Nf2^{-/-}* и MEF *Nf2^{fl/fl}*, часть которых была обработана церуленином (рис. 4)

Рисунок 4 «Измерение внутриклеточных уровней ацетил-коА и малонил-коА с помощью ВЭЖХ/МС»



Результаты эксперимента подтверждают резкое повышение уровня метаболизма в *Nf2*-отрицательных клетках, а также свидетельствуют о различной реакции клеток MEF *Nf2^{-/-}* и MEF *Nf2^{fl/fl}* на воздействие церуленина. Было

обнаружено двукратное повышение базового уровня ацетил-коА в клетках MEF $Nf2^{-/-}$. Базовые уровни малонил-коА в клетках MEF $Nf2^{-/-}$ и MEF $Nf2^{ff}$ отличались незначительно, что, по-видимому, объясняется более высокой скоростью потребления малоната $Nf2$ -отрицательными клетками в последующих реакциях. Под действием церуленина в клетках MEF $Nf2^{-/-}$ содержание ацетил-коА и, особенно, малонил-коА резко повышалось (десятикратная разница для малонил-коА). В клетках MEF $Nf2^{ff}$ уровни данных соединений под действием церуленина не менялись или даже понижались (ацетил-коА), что свидетельствует о существовании отрицательной обратной связи, нарушающейся с утратой гена $Nf2$.

Синтаза жирных кислот осуществляет синтез насыщенных жирных кислот *de novo*, используя малонил-коА в качестве исходного материала. Малонил-коА синтезируется ацетил-коА карбоксилазой из ацетил-коА. Чтобы оценить различия в уровне синтеза жирных кислот в клетках MEF $Nf2^{-/-}$ и MEF $Nf2^{ff}$, мы выполнили иммуноблоттинг с антителами против Fasn, Acc и вспомогательных ферментов липогенеза: Acl, Acecs1, Acs11 и фосфо-Acc и фосфо-Acl. Уровень Fasn и, что ещё важнее, Acc, оказались существенно повышены в клетках MEF $Nf2^{-/-}$. Иммуноблоттинг также показал, что уровень фосфорилирования Acc в этих клетках значительно ниже, чем в контрольных, что является признаком повышения активности этого фермента. Низкий уровень фосфорилирования Acc в клетках MEF $Nf2^{-/-}$ объясняет их слабую чувствительность к 5-йодотуберцидину, механизм действия которого связан с дефосфорилированием Acc. И, соответственно, отсутствие эффекта ТОФК в клетках MEF $Nf2^{ff}$ объясняется низким уровнем экспрессии Acc в этих клетках. Иммуноблоттинг также выявил значительное повышение уровня экспрессии остальных белков, участвующих в липогенезе, в клетках MEF $Nf2^{-/-}$.

Мы также выполнили количественную ПЦР (кПЦР) для оценки уровня экспрессии генов белков, участвующих в липогенезе. Результаты показали значительное повышение уровня экспрессии всех исследуемых генов в клетках линии MEF $Nf2^{-/-}$, причём наиболее существенные различия наблюдались в группе генов, продукты которых связаны с реакциями бета-окисления жирных кислот.

Реэкспрессия белка мерлин в клетках линии SC4-9 сопровождалась снижением уровня продукции белков, вовлечённых в липогенез, повышением уровня фосфорилирования Асс и снижением экспрессии генов белков, участвующих в синтезе жирных кислот.

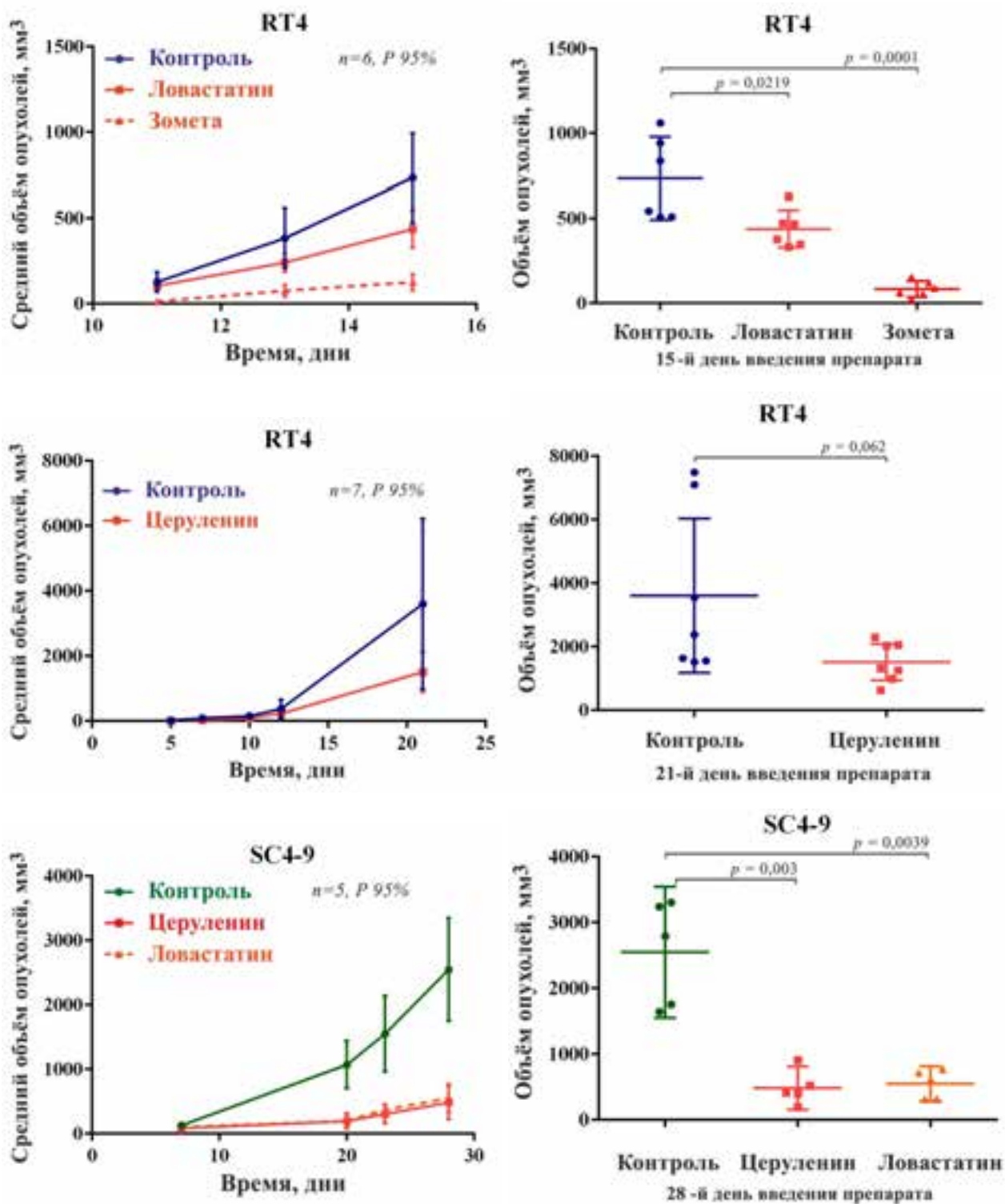
Обнаруженные различия в уровнях экспрессии генов и продукции и фосфорилирования белков, вовлечённых в синтез жирных кислот, доказывают, что липогенез значительно повышен в *Nf2*-отрицательных клетках. В то же время, повышение экспрессии генов и продукции белков, связанных с бета-окислением жирных кислот, а также различия в реакции клеток MEF *Nf2*^{-/-} и MEF *Nf2*^{ff} на воздействие церуленина (например, противоположные изменения уровня *Acs11*), позволяют предположить, что утрата гена *Nf2* вызывает нарушения бета-окисления жирных кислот, что может служить дополнительным механизмом цитотоксичности церуленина в отношении *Nf2*-отрицательных клеток.

Эксперименты по изучению противоопухолевой активности ловастатина, золедроновой кислоты и церуленина в ксенографтной модели НФII на мышцах

Исследования *in vitro* позволили нам понять механизм селективности ингибиторов 3-гидрокси-3-метилглутарил-коА редуктазы и синтазы жирных кислот и позволили предположить, что данные классы соединений могут стать перспективными средствами терапии НФ II. Следующим этапом доклинических испытаний этих веществ стали исследования на животных. Мы провели ряд ксенографтных экспериментов на бестимусных мышцах (nu/nu), используя клетки линий RT4 и SC4-9 (рис. 5).

Введение всех трёх препаратов не приводило к уменьшению объёма уже сформированных опухолей. Однако все три соединения значительно замедляли рост опухолей при использовании их в качестве профилактических средств, то есть, если лечение начинали вскоре после введения опухолевых клеток.

Рисунок 5 «Тестирование противоопухолевой активности ловастатина, зометы и церуленина в ксенографтной модели НФ II на мышах»



Заключение

Была разработана клеточная система для исследования гена *Nf2 in vitro* и выполнен химический скрининг с использованием этой системы. Из девяти соединений-кандидатов, отобранных по результатам скрининга, два: ингибитор 3-гидрокси-3-метилглутарил-коА редуктазы ловастатин и ингибитор синтазы жирных кислот церуленин – успешно прошли валидацию и были отобраны для последующих испытаний.

Было доказано, что ингибирование 3-гидрокси-3-метилглутарил-коА редуктазы вызывает истощение внутриклеточного пула геранилгераниола, что приводит к разъякориванию малой ГТФазы Ras1 и отсоединению её от клеточной мембраны. Было установлено, что Ras1 активируется под действием статинов только в *Nf2*-отрицательных клетках. Было также показано, что активация Ras1, не ассоциированной с клеточной мембраной, приводит к клеточной гибели. Ранее подобная роль Ras1 описана не была. В последующих исследованиях предстоит выяснить механизм Ras1-опосредованной клеточной гибели.

Также было доказано, что утрата гена *Nf2* приводит к метаболическому сдвигу, заключающемуся в резком повышении скорости синтеза жирных кислот. *Nf2*-отрицательные клетки зависимы от нормального функционирования синтазы жирных кислот. Данные исследования позволяют предположить, что утрата гена *Nf2* приводит к нарушению бета-окисления жирных кислот, что негативно отражается на энергетическом метаболизме этих клеток. Снижение продукции энергии и повышенные энергетические потребности, обусловленные высокой скоростью роста, приводят к резкому повышению синтеза жирных кислот и зависимости от нормального функционирования участвующих в синтезе ферментов.

Полученные результаты позволяют предположить обусловленные утратой гена *Nf2* глубокие сдвиги во всех метаболических путях. Известно, что для раковых клеток характерна триада метаболических изменений: предпочтение гликолиза перед митохондриальным окислением (эффект Варбурга), повышение

уровня липогенеза и повышение уровня глютаминолиза. В данной работе было подтверждено повышение уровня липогенеза в *Nf2*-отрицательных клетках. Последующие исследования будут направлены на оценку остальных метаболических путей в этих клетках.

Несмотря на множество открытых вопросов, очевидно, что синтаза жирных кислот, геранилтрансфераза I и 3-гидрокси-3-метилглутарил-коА редуктаза представляют собой перспективные мишени для фармакотерапии НФ II. Гиполипидемические препараты группы статинов, воздействующие на 3-гидрокси-3-метилглутарил-коА редуктазу и препарат золедроновой кислоты Зомета, применяющийся для лечения остеопороза и являющийся ингибитором геранилтрансферазы I, являются уже одобренными к применению лекарственными средствами, и, таким образом, для этих препаратов могут быть начаты клинические испытания II и III фазы на пациентах с НФ II. Хотя церуленин и его аналоги пока находятся на стадии доклинических испытаний, повышенный интерес к этой группе веществ позволяет надеяться, что вскоре появится эффективное лекарственное средство, блокирующее синтазу жирных кислот, которое можно будет применять для терапии НФ II.

ВЫВОДЫ

1. Получена линия мышинных эмбриональных фибробластов, нокаутных по гену *Nf2*, моделирующая нейрофиброматоз II типа.
2. Сравнение данной линии с исходной (контрольной) показало, что полученные *Nf2*-отрицательные клетки отличаются от контрольных по морфологии (имеются признаки дезорганизации актинового цитоскелета, отсутствуют плотные клеточные контакты), большей скоростью роста и устойчивостью к неблагоприятным воздействиям среды.
3. На полученных клеточных линиях проведён скрининг коллекции 486 низкомолекулярных биоактивных соединений, который выявил 9 веществ,

обладающих селективностью в отношении антипролиферативного действия на *Nf2*-отрицательные клетки.

- Из отобранных по результатам скрининга 9 соединений-кандидатов 2 – ингибитор 3-гидрокси-3-метилглутарил-коА-редуктазы ловастатин и ингибитор синтазы жирных кислот церуленин – прошли первичную валидацию результатов скрининга, проявив стабильную селективность в отношении различных *Nf2*-отрицательных клеток. Селективность оказалась также характерна для фармакологических аналогов данных соединений: гиполипидемических препаратов группы статинов и ингибиторов синтазы жирных кислот лютеолина и С75, а реэкспрессия белка мерлин в *Nf2*-отрицательных клетках приводила к обращению токсичности исследуемых соединений.

4. Установлен механизм действия соединений, выбранных по результатам скрининга:

- Селективная цитотоксичность ловастатина в отношении *Nf2*-отрицательных клеток обусловлена рабякориванием малой ГТФазы Ras1 и отсоединением её от клеточной мембраны. Под действием ловастатина Ras1 транслоцируется в ядро и активируется в *Nf2*-отрицательных клетках, вызывая клеточную гибель. В ходе исследований также обнаружена селективная токсичность ингибитора геранилтрансферазы I золедроновой кислоты в отношении *Nf2*-отрицательных клеток.
- Селективная цитотоксичность церуленина обусловлена различиями в уровнях метаболизма жирных кислот в *Nf2*-отрицательных и нормальных клетках. Показано, что под влиянием церуленина накопление промежуточных продуктов синтеза насыщенных жирных кислот в *Nf2*-отрицательных клетках происходит интенсивнее в 1,5 – 2,5 раза по сравнению с контрольными клетками. Также, уровень экспрессии ферментов, участвующих в липогенезе, в *Nf2*-

отрицательных клетках повышен на 30 – 50% по сравнению с контрольными клетками.

5. Ингибитор 3-гидрокси-3-метилглутарил-коА-редуктазы ловастатин, ингибитор геранилтрансферазы I золедроновая кислота и ингибитор синтазы жирных кислот церуленин обладают выраженной противоопухолевой активностью в испытаниях *in vivo* на мышах с ксенографтной трансплантацией мышинных и крысиных шванном. Все три соединения снижали скорость роста шванном на 80% по сравнению с контрольной группой.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Материалы диссертационной работы по изучению метаболического профиля *Nf2*-отрицательных опухолевых клеток могут быть использованы в разработке методов фармакотерапии для лечения НФ II. Описанные в данной работе изменения уровней синтеза жирных кислот, характерные для опухолей, ассоциированных с НФ II, позволяют применить новый подход – воздействие на участвующие в данных метаболических путях ферменты – к терапии данного заболевания и могут способствовать дальнейшему изучению приложения ингибиторов синтазы жирных кислот в терапии доброкачественных опухолей нервной системы. Препараты золедроновой кислоты могут быть рекомендованы для дальнейших исследований возможности их использования в качестве противоопухолевых средств для лечения Ras-зависимых форм рака (метастазирующий рак молочной железы, немелкоклеточный рак лёгкого и др.)

**СПИСОК НАУЧНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ
ДИССЕРТАЦИИ**

1. Степанова Д.С., Чернов Дж., Шимановский Н.Л. Поиск химических веществ для фармакотерапии нейрофиброматоза второго типа // **Химико-фармацевтический журнал. 2014. Т. 48. № 12. С. 9-14**
2. Chow HY, Jubb AM, Koch JN, Jaffer ZM, Stepanova D, Campbell DA, Duron SG, O'Farrell M, Cai KQ, Klein-Szanto AJ, Gutkind JS, Hoeflich KP, Chernoff J. p21-Activated kinase 1 is required for efficient tumor formation and progression in a Ras-mediated skin cancer model. (p21-активируемая киназа 1 необходима для формирования и прогрессии опухолей в модели Ras-опосредованного рака кожи). // **Cancer Research. 2012. Т.72. №22 С.5966-75**
3. Chow HY, Stepanova D, Koch J, Chernoff J. p21-Activated kinases are required for transformation in a cell-based model of neurofibromatosis type 2. (p21-активируемые киназы необходимы для злокачественной трансформации в клеточной модели нейрофиброматоза II типа). // **PLoS One: электронный журнал. 2010. Т. 5 № 11: e13791**. URL:<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0013791>
4. Dina Stepanova; Galina Semenova; Jonathan Chernoff. Fatty acid synthase inhibitors: potential therapy for NF2. «Abstract Book of the NF Conference 2013» Монтеррей Бэй, США, 2013
5. Dina Stepanova; Galina Semenova; Jonathan Chernoff. Fatty acid synthase inhibitors: potential therapy for NF2. «Abstract Book of Fox Chase Cancer Center 18th Annual Postdoctoral and Graduate Student Research Conference»; Филадельфия, США, 2013
6. Dina Stepanova; Jonathan Chernoff. Modulators of geranylation show selective toxicity on *Nf2*-null cells. «Abstract Book of the NF Conference 2011» Джексон Хол, США 2011.
7. Dina Stepanova; Jonathan Chernoff. Modulators of geranylation show selective toxicity on *Nf2*-null cells. «Abstract Book of the 16th Annual Postdoctoral and Graduate Student Conference» Филадельфия, США, 2011.