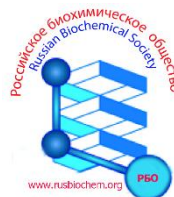

МЕЖДУНАРОДНАЯ АССОЦИАЦИЯ АКАДЕМИЙ НАУК (МААН)
СОЮЗ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЩЕСТВ СТРАН СНГ
ФЕДЕРАЦИЯ ЕВРОПЕЙСКИХ БИОХИМИЧЕСКИХ ОБЩЕСТВ (FEBS)
РОССИЙСКОЕ ОБЩЕСТВО БИОХИМИКОВ И МОЛЕКУЛЯРНЫХ БИОЛОГОВ
РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
РОССИЙСКИЙ ФОНД ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ
РОССИЙСКИЙ НАУЧНЫЙ ФОНД
РОССИЙСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ДРУЖБЫ НАРОДОВ
ИНСТИТУТ ИММУНОФИЗИОЛОГИИ



II ОБЪЕДИНЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ФОРУМ

VI СЪЕЗД ФИЗИОЛОГОВ СНГ

VI СЪЕЗД БИОХИМИКОВ РОССИИ

IX РОССИЙСКИЙ СИМПОЗИУМ «БЕЛКИ И ПЕПТИДЫ»

НАУЧНЫЕ ТРУДЫ

Под редакцией

*Р.И. Сепиашвили, В.А. Ткачука, А.Г. Габимова,
А.И. Григорьева, В.Т. Иванова, М.А. Островского*

Сочи – Дагомыс, Россия
1–6 октября 2019

РАЗРАБОТКА 3D ОПУХОЛЕВЫХ МОДЕЛЕЙ ДЛЯ CAR-T ТЕРАПИИ СОЛИДНЫХ ОПУХОЛЕЙ

А.Х. Валиуллина¹, Р.М. Саярова¹, М.О. Гомзикова¹, М.Н. Журавлева¹, А.В. Петухов^{1,3}, Э.Р. Булатов^{1,2}, А.А. Ризванов¹

¹Казанский федеральный университет, Казань; ²Институт биоорганической биохимии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва; ³НМИЦ им. В.А. Алмазова, Санкт-Петербург, Россия

Иммунотерапия – одно из наиболее перспективных направлений в современной фундаментальной и клинической онкологии. CAR-T клетка представляет собой Т-лимфоцит, в геном которого *ex vivo* встроены ген химерного антигенного рецептора (CAR). Внеклеточный домен данного рецептора обеспечивает распознавание мишени (напр. CD19), а внутриклеточный – активирует сигнальный каскад, приводящий к разрушению клеток-мишеней посредством механизмов цитотоксичности Т-клеток. Однако, несмотря на успех CAR-T терапии в онкогематологии, возможное применение данного подхода против солидных опухолей (карцинома, нейробластома и др.) остается малоизученным. Достижение высокой эффективности CAR T-терапии при терапии солидных опухолей является актуальной научной задачей. Это связано с несколькими причинами, такими как высокая гетерогенность клеточного состава солидных опухолей, необходимость направленной миграции и проникновения клеток CAR-T против градиента давления в строме опухоли, локальная гипоксия и недостаток питательных веществ внутри опухоли, агрессивное микроокружение опухоли. В данном исследовании мы оценили эффективность анти-CD19 CAR-T клеток против монослоя (2D) и многослойных структур (3D) опухолевых клеток, созданных с помощью биопринтера Inkredible (CELLINK) на основе композиции полисахаридного гидрогеля, состоящего из нановолокон целлюлозы и альгината. Для сборки соответствующих лентивирусов нами была использована конструкция с анти-CD19 CAR 2-го поколения, а также рекомбинантный вектор, содержащий ген CD19. Т клетки были выделены из крови здорового человека, затем активированы и трансдуцированы лентивирусом, кодирующим CAR. CD19⁺ клетки были получены путем трансдукции клеток аденокарциномы легкого H522 рекомбинантным лентивирусным вектором. Затем анти-CD19 CAR-T клетки наносили на монослой и многослойные опухолеподобные структуры CD19⁺ клеток H522. Эффективность анти-CD19 CAR-T клеток против CD19⁺ опухолевых клеток оценивали при помощи флуоресцентной и конфокальной микроскопии. Согласно полученным результатам, анти-CD19 CAR-T клетки продемонстрировали существенную эффективность против 2D и 3D моделей CD19⁺ опухолевых клеток. Работа выполнена при поддержке гранта РФФ 19-74-20026.

КЛЕТОЧНАЯ МОДЕЛЬ ИНДУЦИРУЕМОЙ ХРОМОСОМНОЙ ТРАНСЛОКАЦИИ AML1-ETO

В.С. Вьюшков^{1,2}, Н.А. Ломов^{1,2}, М.А. Рубцов^{1,2,3}

¹МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия; ²LIA LFR20 (LIA French-Russian Cancer Research Laboratory) Villejuif, France, Moscow, Russia; ³Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова МЗ РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

Применение химиотерапевтических подходов для лечения злокачественных опухолей может являться причиной развития вторичного острого миелоидного лейкоза. У 12% пациентов с данным заболеванием наблюдается транслокация, приводящая к образованию слитого гена AML1-ETO. Развитие хромосомных транслокаций с участием гена AML1 (RUNX1), регулирующего гемопоэз, связывают с использованием в качестве противоопухолевых препаратов ингибиторов топоизомераз. Удобным способом изучения механизмов, ведущих к появлению транслокаций, является создание модельной клеточной линии, где в значительной доле клеток будут наблюдаться описанные перестройки. Индукция транслокации в такой линии будет обуславливаться процессами негомологичной репарации двухцепочечных разрывов, внесенных системой CRISPR/Cas9. Для создания клеточной линии была собрана плазмида, включающая гены РНК-гидов, подобранных к генам AML1 и ETO, и ген Cas9 с системой индукции транскрипции Tet-ON. Полученная плазмида использовалась для трансфекции клеток лимфобластоидной культуры LCL (RPMI 8866). Индукция хромосомной транслокации AML1-ETO обуславливалась активацией доксициклином гена Cas9, усиление экспрессии которого подтверждается данными количественной ПЦР с обратной транскрипцией. После активации экспрессии была подсчитана частота возникновения хромосомной транслокации AML1-ETO методом количественной ПЦР, а также оценена кинетика ее формирования во времени. На основе трансформированной культуры получена моноклональная линия. Данная клеточная модель использовалась для анализа влияния ингибитора белка репарации MRE11 (Mirtin) на предмет снижения частоты возникновения транслокаций методом количественной ПЦР. Было показано, что данный ингибитор не влияет на частоту формирования транслокации. В результате была получена клеточная линия LCL_iAML/ETO, в которой возможно воспроизведение лейкозогенных транслокаций между генами AML1 и ETO путем активации доксициклином системы CRISPR/Cas9. В дальнейшем такая линия может быть использована для скрининга химических препаратов, способных снижать вероятность хромосомных перестроек.

ХАРАКТЕРИСТИКА SLC34A2 И RAD50 В КАЧЕСТВЕ ПРОГНОСТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ТРИЖДЫ-НЕГАТИВНОГО РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

К. Гавриш¹, Г.З. Мухаметшина², С.В. Петров³, Р.Г. Киямова¹

¹Казанский федеральный университет; ²Республиканский клинический онкологический диспансер; ³Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия

Трижды-негативный подтип рака молочной железы (ТНРМЖ) характеризуется агрессивностью, плохим прогнозом и высокой частотой рецидивов. Это связано, в том числе, с отсутствием чувствительных диагностических и прогностических маркеров, а также мишеней для таргетной терапии. Целью нашего исследования является изучение новых потенциальных прогностических маркеров ТНРМЖ. В работе изучали связь экспрессии фосфатного транспортера NaPi2b и белка репарации RAD50 с общей выживаемостью пациентов с ТНРМЖ. Оба белка были идентифицированы нами ранее с помощью метода

SEREX (serological analysis of cDNA expression libraries) и охарактеризованы как потенциальные маркеры РМЖ. Уровень экспрессии изучали как на уровне РНК, так и на уровне белка с использованием заключенных в парафине архивных опухолевых тканей пациентов с ТНРМЖ с известными данными общей 5-летней выживаемости (ОВ) ($n = 39$). Опухоли пациентов были предоставлены Республиканским Клиническим Онкологическим Диспансером (г. Казань) в соответствии с решением локального этического комитета. Для анализа профиля экспрессии SLC34A2 и RAD50 на уровне РНК использовали количественный ПЦР в режиме реального времени, на уровне белка экспрессию изучали путем иммуногистохимического окрашивания тканевых матриц (Tissue Micro Arrays, TMA). Экспрессию NaPi2b оценивали как выраженную, если окрашивалось более 10% клеток с интенсивностью «++» и более, а экспрессию RAD50 считали выраженной, если окрашивалось более 90% клеток с интенсивностью «++» и более. Статистическую обработку данных проводили с помощью анализа выживаемости Каплана-Мейера, Логранковского теста и критерия Манна-Уитни. Все расчеты проводились в RStudio. Было показано, что выраженная экспрессия на уровне белка гена транспортера NaPi2b ассоциирована с более высокой ОВ больных ТНРМЖ (p -значение = 0,034). Интересно отметить, что на уровне гена такой закономерности выявлено не было. Для гена RAD50, как на уровне белка, так и на уровне РНК, не было выявлено связи с ОВ больных ТНРМЖ. Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной в рамках государственной поддержки Казанского (Приволжского) федерального университета в целях повышения его конкурентоспособности среди ведущих мировых научно-образовательных центров.

ИЗУЧЕНИЕ ВКЛАДА IL-6, ПРОИЗВОДИМОГО МИЕЛОИДНЫМИ КЛЕТКАМИ, В РАЗВИТИЕ АОМ-DSS-ИНДУЦИРОВАННОГО КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА МЫШИ

Е.О. Губернаторова^{1,2}, Е.А. Горшкова^{1,2}, О.А. Намаканова^{1,2}, А.И. Полинова¹, М.С. Друцкая^{1,2}, С.А. Недоспасов^{1,2}

¹Биологический факультета МГУ им. М.В. Ломоносова; ²Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия

Колоректальный рак широко распространен в развитых странах и, как правило, ассоциирован с хроническими воспалительными заболеваниями кишечника. Повторяющиеся циклы повреждения кишечного эпителия в контексте воспалительного микроокружения приводят к перерождению ткани и развитию опухоли. Одним из ключевых регуляторов данного процесса является провоспалительный цитокин интерлейкин-6 (IL-6). Так, в моделях колоректального рака у мышей было показано, что дефицит IL-6 во всех клетках организма приводит к снижению числа возникающих в кишечнике опухолей, однако вклад конкретных клеточных источников IL-6 в патогенез рака остается не понятен. Целью настоящей работы было изучение роли IL-6, продуцируемого миелоидными клетками, в мышинной модели рака кишки. Для индукции колоректального рака мышам однократно вводили 12 мг/кг азоксиметана (АОМ), обладающего генотоксическими свойствами. Далее, в течение 7–8 недель для поддержания хронического колита мыши получали с питьевой водой раствор декстрана сульфата натрия (DSS) курсами по 5 дней с перерывами на 14 дней. В каждый эксперимент были взяты 4 группы мышей: с полным нокаутом по IL-6 (IL-6 KO), с дефицитом IL-6 в макрофагах (Mlys-IL-6 KO) и в дендритных клетках (CD11c-IL-6 KO), а также мыши дикого типа (WT). Мышей ежедневно взвешивали для оценки тяжести колита. В конце эксперимента определяли количество и размер опухолей, длину толстой и слепой кишки, а также измеряли относительную экспрессию генов, кодирующих провоспалительные цитокины, в тканях кишечника. Было показано, что IL-6 KO и CD11c-IL-6 KO мыши более чувствительны к DSS-индуцированному воспалению, чем Mlys-IL-6 KO и WT мыши. При этом опухолевая нагрузка снижалась как у мышей с полным, так и с тканеспецифическими нокаутами IL-6, по сравнению с мышами дикого типа. В кишечнике у всех групп с дефицитом IL-6 показано подавление экспрессии генов Il22 и Il17a, кодирующих цитокины, необходимые для патогенеза как колоректального рака, так и колита. Полученные результаты свидетельствуют о том, что IL-6, продуцируемый миелоидными клетками, важен для развития колоректального рака у мышей в модели АОМ-DSS, причем IL-6 из макрофагов и дендритных клеток обладает разным эффектом в контексте этой экспериментальной модели. *Работа поддержана грантом РНФ № 19-75-30032*

СНА-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ЛАНДШАФТ ОПУХОЛИ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В СЛУЧАЯХ ФЕНОМЕНА ГЕНЕТИЧЕСКОГО «ЗАМИРАНИЯ» В ПРОЦЕССЕ ПРОВЕДЕНИЯ НЕОАДЬЮВАНТНОЙ ХИМИОТЕРАПИИ

И.В. Дерюшева¹, А.М. Певзнер¹, М.М. Цыганов¹, М.К. Ибрагимова^{1,2}, Н.В. Литвяков^{1,2}

¹НИИ онкологии Томского НИМЦ, ²Биологический институт Национального исследовательского Томского государственного университета, Томск, Россия

При изучении изменений CNA (Copy Number Aberration)-генетического ландшафта в опухоли молочной железы при проведении неоадьювантной химиотерапии (НАХТ), было установлено, что у части пациентов не происходит никаких генетических изменений опухоли, несмотря на широкий спектр изменения объема опухоли под действием НАХТ. Мы назвали данный феномен – феноменом генетического «замирания». Установлено, что у части пациентов с феноменом «замирания» метастазы развиваются и «замирание» оказывается неустойчивым, у части больных «замирание» устойчивое и метастазы не развиваются, как минимум в течении 5 лет. Целью нашей работы было изучить особенности CNA-генетического ландшафта у больных с феноменом устойчивого и неустойчивого генетического «замирания» опухоли. Материалы и методы. В исследование были включены 42 больных РМЖ IА–IIIВ стадии, получавшие 4–8 курсов НХТ и послеоперационное лечение. Для оценки CNA-генетического ландшафта проведен микроматричный анализ опухоли до лечения и после НХТ на ДНК-чипах Affymetrix CytoScanTM HD Array. Результаты. Из 42 больных у 8 (19%) больных было отмечено образование новых клонов с амплификациями и делециями и высокая частота метастазирования (75%). У 18/42 больных (43%) отмечается снижение частоты делеций и амплификаций в опухоли под действием НХТ и частота метастазирования 1/18 (5,6%). Феномен генетического «замирания» наблюдался у 16/42 пациентов (38%). У 5 из этих пациентов (31%) развились метастазы, т.е. феномен «замирания» оказался неустойчивым. В целом CNA-генетический ландшафт опухоли у пациентов с феноменом «замирания» характеризуется низкой частотой амплификаций и делеций, по сравнению со всеми остальными пациентами. Больные с неустойчивым