

**КОЧЕТКОВА**

**Елена Юрьевна**

**РОЛЬ АУТОФАГИИ В ОТВЕТЕ RAS-ЭКПРЕССИРУЮЩИХ  
ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК НА ДЕЙСТВИЕ КИНАЗНЫХ  
ИНГИБИТОРОВ**

03.03.04 - Клеточная биология, цитология, гистология

Автореферат

Диссертации на соискание ученой степени

Кандидата биологических наук

Санкт-Петербург

2019

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте цитологии Российской академии наук, Санкт-Петербург

**Научный руководитель:** Кандидат биологических наук  
**Поспелова Татьяна Викторовна**  
Ведущий научный сотрудник  
Лаборатории молекулярных основ  
дифференцировки клеток  
Института цитологии РАН

**Официальные оппоненты:** Доктор медицинских наук, профессор  
**Зарицкий Андрей Юрьевич**  
Директор Института гематологии  
Федерального государственного  
бюджетного учреждения  
«НМИЦ им. В.А.Алмазова»  
Минздрава России  
Доктор биологических наук  
**Гамбарян Степан Петрович**  
Главный научный сотрудник  
Лаборатории сравнительной физиологии дыхания  
Федерального государственного  
бюджетного учреждения  
«Институт эволюционной физиологии и биохимии  
им. И.М.Сеченова»  
Российской академии наук

**Ведущая организация:** Федеральное государственное  
бюджетное учреждение науки  
**«НИИ онкологии им. Н.Н.Петрова»**  
Минздрава России.

Защита диссертации состоится \_\_\_\_\_ в \_\_\_\_\_ часов на заседании  
Диссертационного совета Д 002.230.01 на базе Института цитологии РАН по адресу:  
194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий проспект, д. 4.

Сайт института: <http://www.incras.ru/>

Адрес электронной почты института: [cellbio@incras.ru](mailto:cellbio@incras.ru)

Факс института: (812) 297-35-41

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института цитологии РАН и на  
сайте <http://www.incras.ru/>

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2019 г.

Ученый секретарь Диссертационного совета,  
кандидат биологических наук

Е.В. Каминская

## 1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

*Актуальность проблемы.* Несмотря на значительный прогресс в борьбе с опухолевыми заболеваниями, они остаются, по данным ВОЗ, одной из основных причин смерти человека. Малая ГТФаза Ras принадлежит к числу наиболее часто мутирующих протоонкогенов, и мутации Ras обнаруживаются примерно в 30% всех опухолей человека. Ras-опухоли относятся к числу наиболее агрессивных и не отвечающих на терапию, так как мутантный Ras обеспечивает толерантность таких опухолей к терапии за счет активации процесса цитопротективной аутофагии. Поэтому целесообразным подходом является поиск новых мишеней этого сигнального пути. Таким образом, понимание механизмов устойчивости Ras клеток к противоопухолевым агентам и способов ее преодоления принципиально важно для разработки успешных стратегий терапии Ras-экспрессирующих опухолей.

*Степень разработанности проблемы.* Современная стратегия борьбы с Ras-трансформированными клетками основана на применении киназных ингибиторов Ras-пути. Накопленные к настоящему времени данные свидетельствуют о том, что восстановление жизнеспособности клеток при действии противоопухолевых агентов связано с активацией цитопротективной аутофагии, уничтожающей поврежденные органеллы и белки. Именно таким образом Ras-экспрессирующие опухоли преодолевают повреждающее действие ингибиторов. Кроме того, аутофагия в Ras-клетках поддерживает жизнеспособность за счет контроля над пулом функциональных митохондрий путем элиминации поврежденных, являющихся источником АФК (Guo et al, 2011; Guo et al, 2016). Ключевым регулятором клеточного старения и аутофагии является киназа в комплексе mTORC1 (mammalian Target of Rapamycin Complex 1). Ras/Raf/MEK/ERK-каскад входит в число позитивных регуляторов комплекса mTORC1, и в Ras-экспрессирующих опухолевых клетках

mTORC1 конститутивно активен. mTORC1 стимулирует синтез белков, липидов и нуклеотидов, одновременно ингибируя катаболические процессы через подавление аутофагии, и способствует, таким образом, активной клеточной пролиферации. Аутофагия в клетке находится под контролем киназ AMPK и mTOR. При действии на опухолевую клетку повреждающих агентов активируется AMPK, которая ингибирует mTOR, позволяя развиваться и завершиться процессу цитопротективной аутофагии. Особенностью стареющих клеток является конститутивно высокая, независимая от пула аминокислот и митогенных сигналов, активность mTOR, сдерживающая AMPK-активированную аутофагию, но поддерживающая базальный уровень аутофагии, отвечающий за жизнеспособность клеток. Следовательно, один из главных маркеров старения - конститутивно высокая активность mTORC1, - при действии цитостатиков и киназных ингибиторов, может быть фактором, лишаящим аутофагию ее цитопротективных свойств и вызывающим гибель поврежденных клеток. Таким образом, процессы старения, аутофагии и канцерогенеза тесно связаны и определяют жизнеспособность опухолевых клеток, а целенаправленное их таргетирование в Ras-экспрессирующих клетках будет способствовать их гибели.

*Цель работы.* Использовать экспериментальные подходы, основанные на инактивации аутофагии при одновременном действии индукторов старения и киназных ингибиторов Ras-ERK пути, позволяющие более эффективно элиминировать Ras-трансформированные опухолевые клетки.

*Задачи*

1. Оценить эффективность антипролиферативного действия ингибитора MEK/ERK-пути по изменению жизнеспособности и подавлению пролиферативной активности в контрольных и стареющих Ras-экспрессирующих опухолевых клетках.

2. Исследовать закономерности прохождения разных стадий аутофагического ответа в стареющих Ras-трансформантах при подавлении MEK/ERK-пути, вызывающем апоптотическую гибель.
3. Оценить жизнеспособность Ras-трансформантов, индуцированных к старению, при подавлении активности комплекса mTORC1, являющегося регулятором аутофагии.
4. Установить роль MEK/ERK-пути в регуляции аутофагического ответа и поддержании жизнеспособности клеток после ДНК-повреждающего действия ионизирующего облучения.

*Основные положения, выносимые на защиту*

1. Толерантность контрольных Ras-экспрессирующих опухолевых клеток к ингибитору MEK/ERK-пути связана с активацией AMPK-зависимой цитопротективной аутофагии, удаляющей поврежденные митохондрии и восстанавливающей жизнеспособность клеток;
2. Подавление MEK/ERK в стареющих клетках вызывает апоптотическую гибель, связанную с неспособностью элиминировать поврежденные митохондрии, в основе которой лежит формирование гипертрофного гиперсекреторного фенотипа и TASC-компартов, подавляющих процесс слияния аутофагосом с лизосомами;
3. При подавлении активности комплекса mTORC1 клеткам требуется активный MEK/ERK-путь для осуществления альтернативного аутофагии механизма спасения стареющих клеток, связанного с изоляцией поврежденных митохондрий и выведением их за пределы клеток;
4. Ингибирование MEK/ERK-пути приводит к подавлению аутофагии и усилению клеточной гибели при действии рентгеновского облучения.

*Научная новизна.* В исследовании показан новый способ массового уничтожения Ras-экспрессирующих опухолевых клеток грызунов и человека, который основан на использовании киназных ингибиторов Ras-

пути совместно с ингибитором гистоновых деацетилаз бутиратом натрия, индуцирующим процесс клеточного старения. Неспособность стареющих клеток развивать полноценную цитопротективную аутофагию в ответ на подавление MEK/ERK обусловлена высокой активностью mTORC1, становлением гипертрофного, гиперсекреторного фенотипа и формированием TASC (TOR-Autophagy Spatial Coupling Compartment) - компартментов, которые не позволяют аутофагосомам сливаться с лизосомами при подавлении активности MEK/ERK.

*Апробации.* Полученные в работе результаты были доложены на: V Молодежной конференции по молекулярной и клеточной биологии Института Цитологии РАН, 2017; International Cell Senescence Association (ICSA) Conference (May 16th-19th, 2017, Paris, France); Cell Symposium: Aging and Metabolism. Sitges, Spain, 9 – 12 июля 2016; Клеточная биология: проблемы и перспективы. 2 - 5 октября 2017; VI Молодежная конференция по молекулярной и клеточной биологии Института цитологии РАН, 25–27 апреля 2018. 26th Euroconference on apoptosis. Cell Death in disease: from small molecules to translational medicine. 10-12 October 2018, Saint-Petersburg; Научная конференция «Современные проблемы физико-химической и клеточной биологии: от молекул к живым системам». Москва, 24-25 октября 2018г.

*Личный вклад автора.* Автором получены основные результаты, самостоятельно написаны тексты диссертации и автореферата, статьи и доклады на конференции. Трансмиссионная электронная микроскопия была выполнена совместно с сотрудниками лаборатории морфологии клетки Мартыновой Мариной Георгиевной и Быстровой Ольгой Алексеевной. Результаты проточной цитометрии получены совместно с Аксеновым Николаем Дмитриевичем, работа с рентгеновским облучателем осуществлялась Талецким Сергеем Владимировичем.

*Структура диссертации.* Диссертация построена по традиционной схеме и содержит разделы «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и

методы», «Результаты», «Обсуждение», «Заключение и Выводы» и «Список цитируемой литературы», состоящий из 197 пунктов, из них 196 на английском языке. Диссертация изложена на 149 страницах, проиллюстрирована 36 рисунками.

*Публикации.* По теме диссертации опубликовано 10 работ: 6 статей в журналах рекомендованного перечня ВАК и 4 тезисов.

*Финансовая поддержка.* Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №14-50-00068.

## 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

*Клеточные линии.* В работе использованы эмбриональные фибробласты крысы, трансформированные онкогенами *E1A+cHa-Ras* (ERas) и KRas-экспрессирующие клетки аденокарциномы легкого человека A549. Клетки культивировали в питательной среде Игла в модификации Дальбекко, содержащей 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота с добавлением гентамицина при 5% CO<sub>2</sub> и 37°C.

*Ингибиторы.* Использованы ингибитор MEK/ERK-пути PD0325901 (PD, 1 µM, Sigma); ингибитор деацетилаз гистонов бутират натрия (NaBut, 4 mM, Sigma); киназный ингибитор mTOR - pp242 (200 nM, Sigma).

*Оценка жизнеспособности клеток с помощью МТТ-теста.* Клетки высевали на 12-луночную плату в плотности 20000 клеток на лунку и культивировали с ингибиторами. Через 24, 72, 120ч эксперимента среду с ингибиторами заменяли на раствор МТТ (0,5 мг/мл) и инкубировали при 37°C в течение 1 часа. Формазан растворяли в DMSO и вносили в лунки 96-луночного планшета и измеряли количество формазана при длине волны 595 нм.

*Оценка пролиферативной активности клеток* проводилась при помощи анализа кривых клеточного роста. Клетки культивировали с ингибиторами в течение пяти суток. Через 24, 72, 120ч производился подсчет клеток, на точку использовали три 35 мм чашки.

*Анализ клоногенной выживаемости клеток.* Клетки культивировали с ингибиторами в течение необходимого времени. В указанное время клетки трипсинизировали и пересевали на новые чашки в среду без ингибиторов в плотности 100 клеток/1 мл в 35 мм чашку. Клоны окрашивали раствором кристалл-виолета.

*Оценку размера клеток* проводили на цитометре Odam (Brucker, Франция). Клетки предварительно пермеабелизовали в течение 30 мин в присутствии 0.01 % сапонины, и обрабатывали раствором РНКазы А (0.1 мг/мл) в присутствии пропидия иодида при 37 °С в течение 15 мин.

*Иммунофлуоресценция.* Иммунофлуоресцентный анализ осуществляли по стандартной методике. Изображения получали при помощи конфокальных микроскопов Leica TCS SL и Olympus FluoView 3500, ядра окрашивали DAPI.

*Вестерн-блоттинг.* Вестерн-блоттинг осуществляли по стандартной методике. Клетки лизировали в буфере RIPA (1 % Igepal, 0.5 % деоксихолата натрия, 0.1 % SDS, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 60 mM NaF, 50<sup>X</sup> коктейль протеазных и фосфатазных ингибиторов). Содержание белка в пробах определяли по методу Брэдфорд. Детекцию сигнала осуществляли с помощью системы геле-документации GeneSys.

*Выявление фрагментации ДНК* методом электрофореза в агарозном геле. Электрофорез ДНК проводили по стандартной методике. Выявление нуклеосомного повтора осуществляли с помощью трансиллюминатора Vilber Lourmat (Vilber, Германия). В качестве позитивного контроля фрагментации ДНК использовали клетки ERas после сывороточного голодания. В качестве маркера использована 100 bp DNA Ladder (Invitrogen)

*Оценка повреждения митохондрий.* Оценку повреждений митохондрий производили с использованием Mitotracker Green, Mitotracker Red, Mitotracker Orange в соответствии с инструкциями производителя (Thermo

Fischer). Изображения получали на конфокальном микроскопе Leica TSC5. Ядра окрашивали Hoechst 33342.

*Измерение содержания активных форм кислорода (АФК).* Проводили с использованием красителя DCF-DA в концентрации 10 мг/мл. В указанное на графиках время в культуральную среду добавляли краситель и инкубировали клетки 30 мин при 37°C. Измерение АФК проводили при длине волны  $E_x/E_m=495/529$

*Окрашивание лизосом с помощью LysoTracker Green.* Лизосомы выявляли с помощью 100 нМ красителя LysoTracker Green (Thermo Fischer).

*Трансмиссионная электронная микроскопия.* Клетки после культивирования фиксировали в смеси 2,5% глutarальдегида в 0,1 М какодилатном буфере, инкубировали с тетроксидом осмия, после дегидратации заключали в смесь Арадит-Эпон. Изображения были получены с помощью микроскопа Zeiss Libra 120.

*Анализ активности ассоциированной со старением  $\beta$ -галактозидазы* проводили по описанному методу (Dimri et al, 1995) при pH=6.0. Клетки фотографировали на микроскопе Pascal (Zeiss). Для колориметрической оценки активности фермента проводили измерение при длине волны 595 нм.

*Измерение содержания белка* в клетках проводили по методу Брэдфорд. *Использованные в работе антитела:* pan-LC3 (MBL, #PM036); p62/SQSTM1 (BD Transduction, #610077); LAMP1 (Santa-Cruz, sc-17768); pan-Ras (Oncogene Science, #OP40); E1A (Santa-Cruz, sc-58658); phospho-Ulk1 Ser757 (Cell Signaling, #6888S); phospho-Ulk1 Ser555 (EMD Millipore, ABC124); phospho-AMPK T172 (Cell Signaling, #2535S); phospho-4E-BP1 Thr37/46 (Cell Signaling, #2855S); phospho-S6 Ser235/236 (Cell Signaling, #2211S); phospho-42/44 MAPK Thr202/Tyr204 (Cell Signaling, #4377S); mTOR (Cell Signaling, #2983S). Goat-anti-Rabbit IgG (H+L) Alexa Flour 488 (Invitrogen, A11088); Rabbit-anti-Mouse IgG (H+L) Alexa Fluor 568

(Invitrogen, A11031); Goat-anti-Rabbit IgG HRP Conjugated (Sigma-Aldrich, A0545); Rabbit-anti-Mouse IgG HRP Conjugated (Sigma-Aldrich, A9044).

*Статистическая обработка.* Денситометрию бэндов Вестерн-блоттинга проводили с помощью программы GelPro3. Анализ флуоресцентных изображений осуществляли с помощью ImageJ. Данные предоставлены как среднее как минимум трех экспериментов  $\pm$  стандартная ошибка среднего. Различия считали достоверными при  $P < 0,05$ .

### 3. ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

#### 3.1. Трансформанты ERas восстанавливают жизнеспособность при ингибировании MEK/ERK за счет активации цитопротективной AMPK-зависимой аутофагии.

Ингибирование активности MEK/ERK в контрольных клетках ERas приводит к временному снижению пролиферативной активности клеток, согласно данным МТТ-теста, кривых роста и клоногенной выживаемости (Рис. 1).

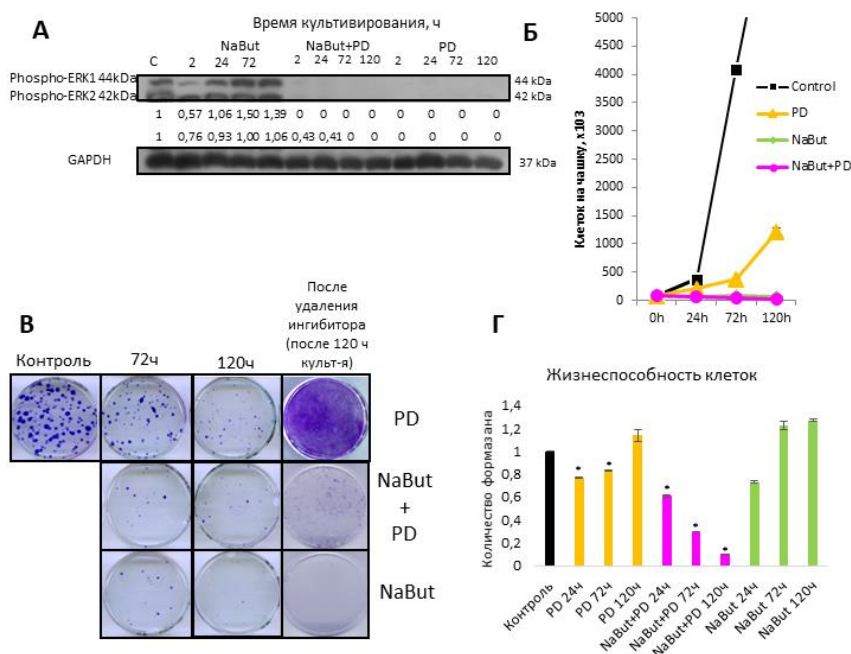


Рис. 1. Изменение жизнеспособности и пролиферативной активности клеток ERas в ответ на ингибирование MEK/ERK-пути. А. Уровень фосфорилирования ERK1,2 после 120ч действия ингибиторов. Б. Изменение пролиферативной активности по кривым клеточного роста. В. Клоногенная выживаемость. Г. Изменение жизнеспособности клеток, проанализированное с помощью МТТ-теста. Указаны средние значения по трем повторам  $\pm$  ошибка среднего. \* $P \leq 0,05$

Однако через 120 ч жизнеспособность и пролиферативная активность клеток начинают восстанавливаться (Рис. 1). В ряде исследований было показано, что подавление активности Ras/Raf/MEK/ERK-пути приводит к

повреждению митохондрий (Monick et al, 2008). Согласно данным трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ) и окрашивания прижизненными красителями Mitotracker Green (окрашивает все митохондрии, вне зависимости от потенциала) и Mitotracker Red (потенциал-зависимый, окрашивает неповрежденные митохондрии), в клетках ERas подавление фосфорилирования ERK1,2-киназ через 24 ч приводит к повреждению митохондрий (Рис. 2А,Б). Повреждение митохондрий влечет за собой падение уровня АТФ и активацию AMPK, которая видна уже через 2 ч, согласно накоплению фосфо-AMPK по данным Вестерн-блоттинга. AMPK фосфорилирует по Ser555 киназу Ulk1, которая является ключевым компонентом комплекса, активирующего аутофагию (Рис. 2В). Происходит интенсивная конверсия белка-маркера аутофагии LC3 из цитоплазматической формы LC3 I в форму LC3 II, ассоциированную с мембранами аутофагосом. Аутофагия длится в течение 72 ч и завершается полным слиянием аутофагосом с лизосомами, как следует из данных ИФ по колокализации маркера лизосом LAMP1 с маркером аутофагосом LC3 (Рис. 2Г). Согласно картинам ТЭМ, через 72 ч поврежденные митохондрии изолированы в везикулах и, как показывает окрашивание митохондрий Митотрекером Red, в это же время начинается восстановление пула неповрежденных митохондрий в цитозоле. Таким образом, аутофагия обеспечивает полноценную элиминацию поврежденных митохондрий и восстановление пролиферативной активности клеток. Аутофагия, активирующаяся при ингибировании MEK/ERK-пути, протекает, несмотря на высокую активность комплекса mTORC1, который должен ее ингибировать. Аутофагия находится под контролем двух ключевых регуляторов – mTORC1 (который осуществляет инактивационное фосфорилирование Ulk1-киназы по сайту Ser757) и AMPK, которая осуществляет активационное фосфорилирование Ulk1. Высокая активность mTORC1 подтверждена высоким уровнем фосфорилирования его нижележащих мишеней (ингибитора фактора

инициации элонгации трансляции 4E-BP1 и рибосомального белка S6 (Рис. 3А). mTORC1 сохраняет высокую активность, несмотря на подавление MEK/ERK-пути, который является его позитивным регулятором. Клетки с повышенной активностью mTORC1, остановленные в цикле, имеют предпосылки для развития программы старения, однако маркеры старения в клетках (SA- $\beta$ -Gal, увеличение размера и содержания белка на клетку) при ингибировании MEK/ERK-пути

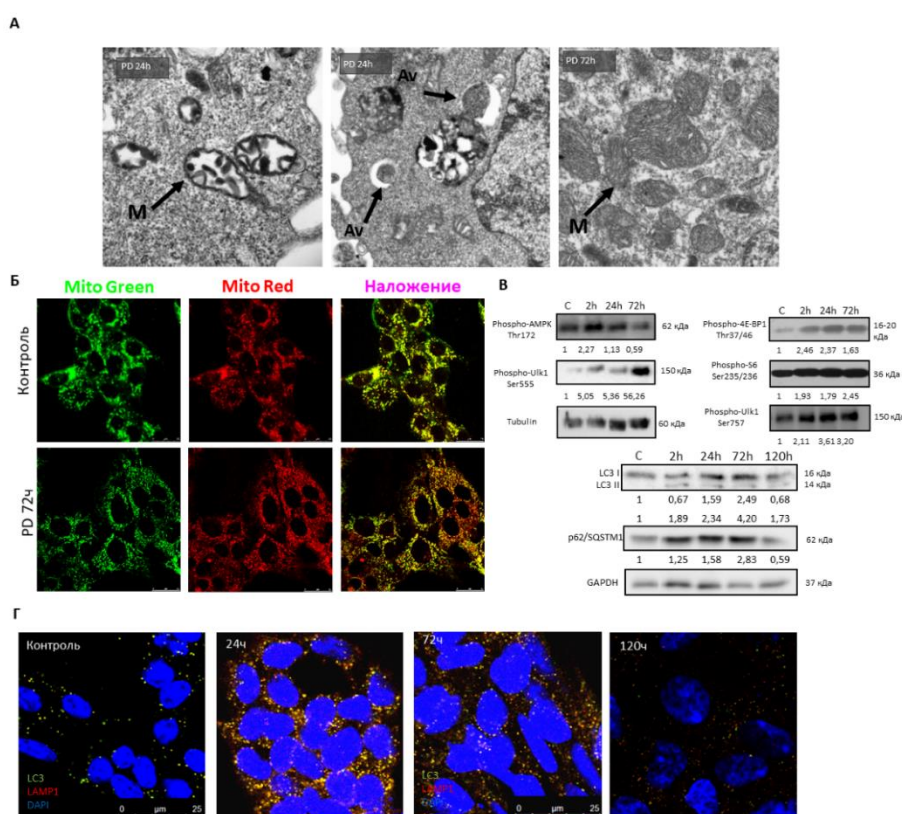


Рис 2. Митохондрии, поврежденные при ингибировании MEK/ERK-пути, удаляются за счет активации цитопротективной аутофагии. А. ТЭМ клеток после 72ч ингибирования MEK-киназ. Стрелки показывают поврежденные митохондрии (m), которые изолируются в везикулы (Av) Б. Анализ митохондриальной активности с помощью Mitotracker Green и Red. В. Поведение маркеров и белков-регуляторов аутофагии. Г. Аутофагия завершается полным слиянием аутофагосом с лизосомами, ИФ с АТ к маркеру аутофагии LC3 и маркеру

лизосом LAMP1.

не выявляются. АМРК-индуцированная аутофагия в данном случае приводит к снижению экспрессии ряда маркеров старения.

### 3.2. *Стареющие клетки не способны завершать аутофагию в ответ на ингибирование MEK/ERK-пути и гибнут апоптозом.*

Подавление MEK/ERK активности в клетках, которые индуцировали к старению с помощью бутирата натрия (NaBut), вызывает массовую гибель (Рис. 1Г). В стареющих клетках через 24 ч и 72 ч наблюдается повреждение митохондрий (судя по снижению интенсивности сигнала

потенциал-зависимого красителя Mitotracker Red), а ТЭМ демонстрирует множество поврежденных митохондрий с нарушенной и разреженной структурой крист (Рис. 3А). Однако в отличие от контрольных клеток, подвергавшихся ингибированию MEK/ERK-пути, через 72 ч поврежденные митохондрии не элиминируются, поскольку они не попадают в аутофаголизосомы. Накопление поврежденных митохондрий приводит к повышению содержания АФК и активации каспаз, которые в итоге индуцируют апоптотическую гибель, подтвержденную данными по нуклеосомной фрагментации ДНК (Рис. 3Б,В). Несмотря на то, что подавление MEK/ERK активирует аутофагию в стареющих клетках, процесс деградации поврежденных митохондрий блокирован, что говорит о нарушении заключительных стадий аутофагии.

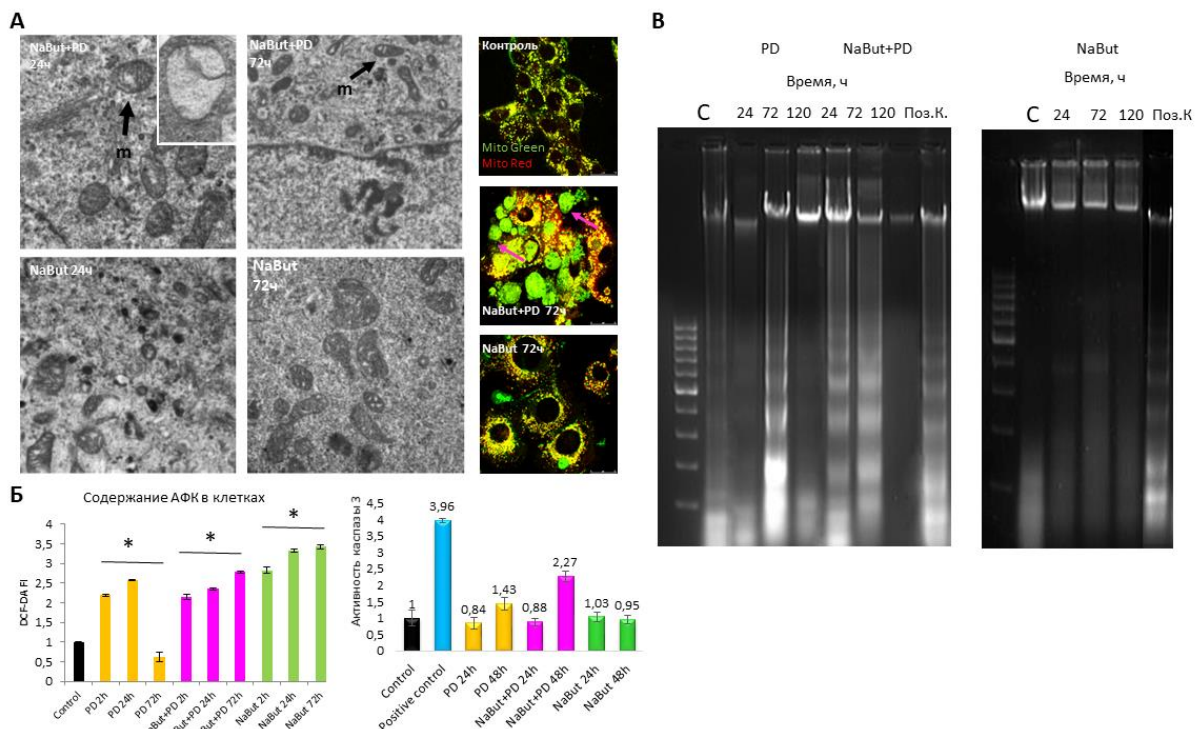


Рис 3. Индуцированные к старению ERas не могут элиминировать поврежденные митохондрии и гибнут апоптозом. А. ТЭМ клеток и анализ активности митохондрий с помощью Mitotracker, стрелки показывают поврежденные митохондрии. Обозначения на ТЭМ-изображениях: m – митохондрии. Б. Содержание АФК в клетках и активность каспазы 3 после 72ч ингибирования MEK/ERK. В. ДНК-форез в агарозном геле, демонстрирующий нуклеосомную фрагментацию ДНК в клетках при действии MEK/ERK-ингибитора. \*P≤0,05

Обнаружено, что через 2 ч – 24 ч после подавления MEK/ERK и повреждения митохондрий активируется AMPK-зависимая аутофагия, инициированная фосфорилированием UlkSer555 (Рис. 4А). Однако в это время наблюдается слабая (по сравнению с контрольными клетками, в которых подавлен MEK/ERK-путь) конверсия LC3-I в LC3-II, а через 24 ч и 72 ч ассоциированная с аутофагосомами форма LC3-II не выявляется, и общее количество LC3 падает. В пользу нарушения процесса аутофагии говорят и данные ИФ-анализа с антителами к LAMP1 и LC3, согласно которым в старых клетках при ингибировании MEK/ERK-пути не происходит интенсивного слияния аутофагосом с лизосомами, которое выявлено при подавлении MEK/ERK в контрольных клетках (Рис. 4Б). Это дает основания считать, что аутофагия, возникающая в стареющих клетках при подавлении MEK/ERK, дефектна. Этот тип аутофагии, в частности селективная ее форма, митофагия, не может обеспечить удаление поврежденных митохондрий.

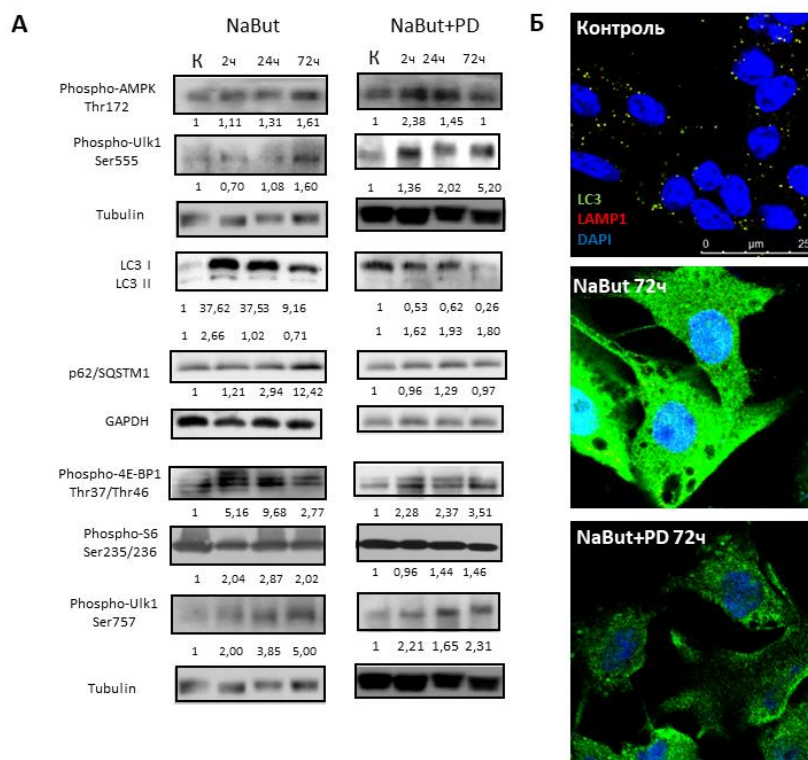


Рис 4. В стареющих клетках при ингибировании MEK/ERK-пути процесс слияния аутофагосом с лизосомами блокирован. А. Поведение маркеров и регуляторов аутофагии. Б. Отсутствие слияния аутофагосом с лизосомами в старых клетках при ингибировании MEK/ERK.

Неспособность стареющих клеток развивать полноценную аутофагию может быть связана с высокой активностью

mTORC1, которая нарушает AMPK-индуцированную аутофагию в стареющих клетках после действия MEK/ERK-ингибитора. Так как

исходные клетки, имеющие высокую активность mTORC1, развивают полноценный аутофагический ответ при действии MEK/ERK-ингибитора, mTORC1 не может быть единственной причиной нарушения аутофагии в стареющих клетках. В связи с этим исследовали факторы, нарушающие аутофагию в стареющих клетках.

### 3.3. *Нарушение терминации аутофагии в стареющих клетках при ингибировании MEK/ERK-пути связано с пространственным разобщением аутофагосом и лизосом в цитоплазме.*

Нами было показано, что одним из проявлений дефектности аутофагии, активирующейся в стареющих клетках, является отсутствие слияния аутофагосом с лизосомами (Рис 4). Это связано с тем, что в стареющих клетках формируется характерный фенотип старения: лизосомы локализуются вместе с mTORC1 в перинуклеарной зоне в так называемых TASC-компартаментах (TOR-autophagy special coupling compartment), связанных с формированием гипертрофного,

гиперсекреторного фенотипа, в то время как аутофагосомы формируются по периферии цитоплазмы (Narita et al, 2011; Carroll et al, 2017). Это приводит к низкой частоте слияния аутофагосом с лизосомами.

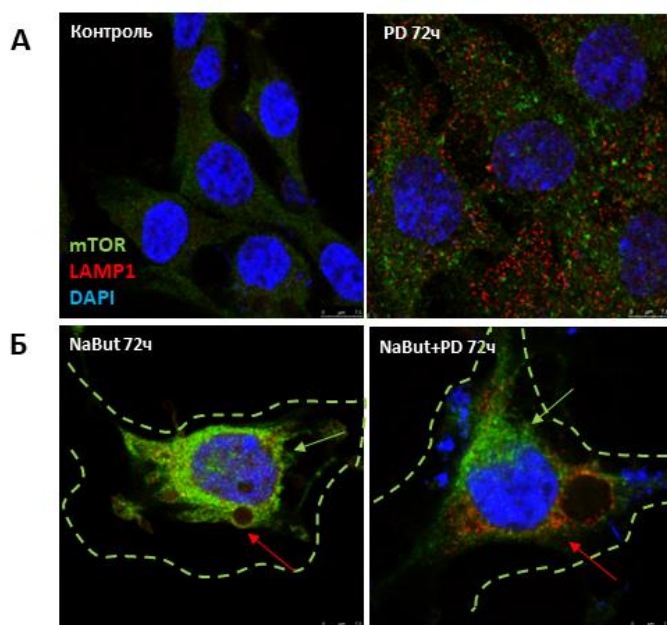


Рис 5. Лизосомы (LAMP1, красные стрелки) и mTOR (зеленые стрелки) в стареющих клетках при ингибировании MEK-киназ находится в разных компартаментах.

Действительно, согласно данным ИФ-анализа с антителами к LAMP1 и mTOR, в стареющих клетках лизосомы и mTOR выявляются вокруг ядра, и после ингибирования MEK/ERK-пути в стареющих клетках лизосомы не

меняют своей локализации (Рис. 5Б). При ингибировании MEK/ERK в контрольных клетках сигнал LAMP1 выявляется по всей цитоплазме, и лизосомы эффективно сливаются с аутофагосомами в ходе цитопротективной аутофагии (Рис. 5А). Таким образом, в стареющих клетках при ингибировании MEK/ERK аутофагосомы не могут эффективно сливаться с лизосомами, аутофагический процесс не завершается и не происходит уничтожения поврежденных клеточных структур, в первую очередь митохондрий, в результате чего процесс завершается апоптозом (Рис. 3).

### *3.4. Релокализация онкогенного Ras с мембраны в цитозоль может блокировать его антиапоптотические функции.*

В Ras-экспрессирующих опухолевых клетках важным регулятором аутофагии является сам онкогенный Ras, который негативно контролирует апоптоз. Кроме Raf/MEK/ERK-пути, Ras имеет много других мишеней,

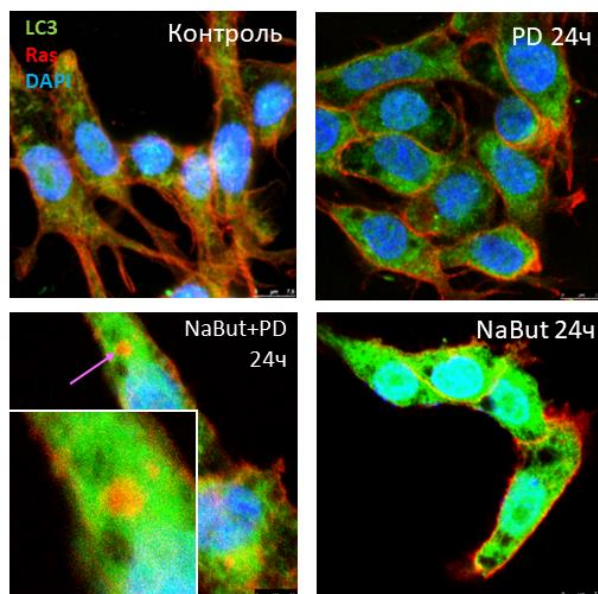


Рис. 6. Локализация Ras в контрольных и стареющих клетках после 24ч ингибирования MEK/ERK-пути. ИФ с АТ к Ras и LC3. Стрелка показывает Ras, локализованный в цитозоле

включая сигнальные пути PI3K и JNK, участвующие в контроле аутофагии. Поскольку в стареющих клетках аутофагический ответ на ингибирование MEK/ERK не развивается, а преобладает апоптотический ответ, были проанализированы локализация белка Ras и изменение его количества.

ИФ-анализ показал, что в стареющих клетках при ингибировании MEK/ERK Ras меняет локализацию – он уходит с внутренней мембраны в цитозоль и выявляется в аутофагосомах, согласно данным по колокализации с LC3 (Рис. 6). Ras – это мембран-связанный белок,

содержание и локализация которого могут менять апоптотический и аутофагический ответы клетки. Захват Ras аутофагосомами в цитозоле негативно сказывается на его регуляторных функциях, включая в первую очередь ингибирование апоптоза, которые он может утрачивать.

Таким образом, ингибирование MEK/ERK-пути в клетках ERas приводит к повреждению митохондрий и инициации AMPK-регулируемой аутофагии. Однако в стареющих клетках активированная AMPK не способна контролировать терминацию аутофагии, поскольку аутофагосомы и лизосомы разобщены. Индукция старения делает устойчивые к химиотерапии Ras-экспрессирующие клетки уникально чувствительными к киназному ингибитору MEK/ERK-пути, что предполагает существование возможности избирательной элиминации стареющих Ras-экспрессирующих клеток.

### 3.5. Подавление активности *mTORC1* не приводит к восстановлению AMPK-зависимой аутофагии и жизнеспособности стареющих клеток при ингибировании MEK/ERK-пути

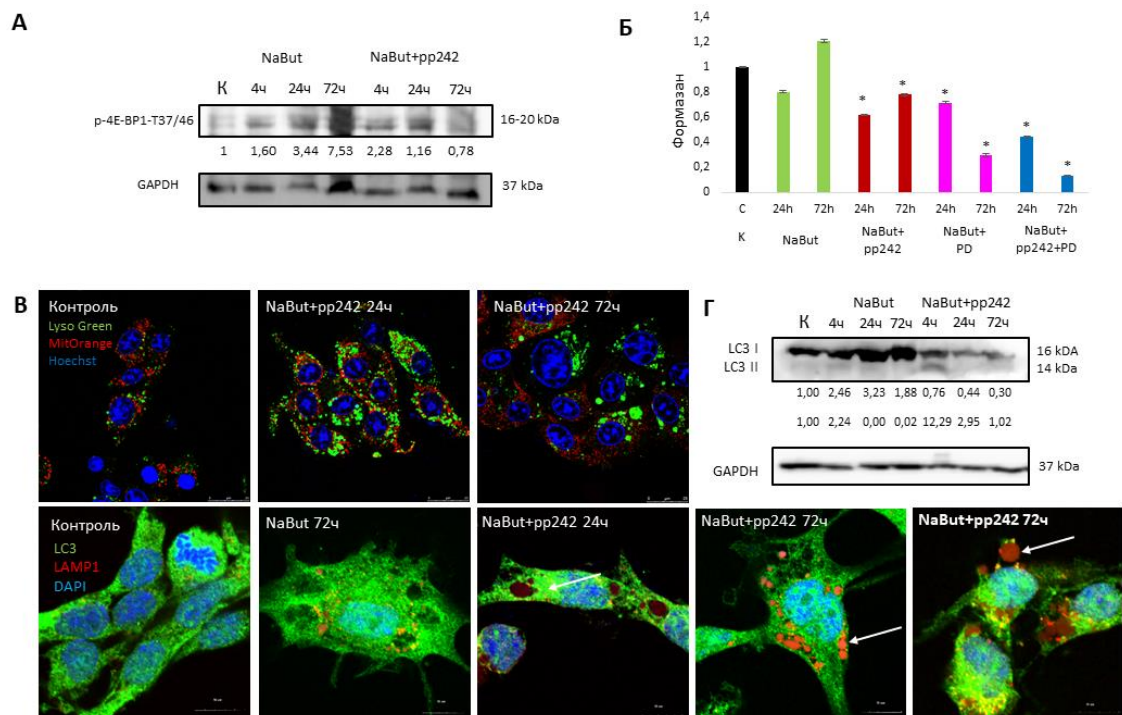


Рис 7. Ингибирование *mTORC1* не спасает стареющие клетки от гибели при ингибировании MEK/ERK-пути. А. 200нМ pp242 снижают уровень фосфорилирования 4E-BP1 в стареющих клетках. Б.

Жизнеспособность клеток при ингибировании mTORC1. В. Ингибирование mTORC1 приводит к повреждению митохондрий и увеличению числа лизосом, согласно данным окрашивания Mitotracker Orange и Lysotracker Green. Г. Подавление аутофагии и изоляция лизосом в полостях при ингибировании mTOR. Стрелками показаны скопления сигнала LAMP1 в вакуолях и за пределами клеток. \* $P \leq 0,05$

Мы показали, что жизнеспособность клеток ERas напрямую связана с целостностью митохондрий. В ряде работ было показано, что повреждение митохондрий оказывает влияние на биогенез лизосом. Комплекс mTORC1 локализован на мембране лизосом, и также способен регулировать их биогенез, координируя таким образом процессы аутофагии не только через подавление активности Ulk1, но и через регуляцию биогенеза лизосом. И в контрольных, и в стареющих клетках ERas при ингибировании MEK/ERK-пути mTORC1 остается активным. Для выяснения роли активности mTORC1 в регуляции AMPK-зависимой аутофагии и жизнеспособности стареющих клеток в ответ на ингибирование MEK/ERK-пути, использовали специфический киназный ингибитор pp242 в концентрации 200 нМ (Рис 7А). Согласно данным МТТ, ингибирование mTORC1 не приводит к восстановлению цитопротективной аутофагии и жизнеспособности клеток (Рис 7Б). Более того, подавление mTORC1 в стареющих клетках приводит к повреждению митохондрий, согласно данным по падению интенсивности свечения Mitotracker Orange, и одновременно к увеличению числа лизосом, по данным окрашивания Lysotracker Green (Рис. 7В). mTOR-зависимая аутофагия индуцируется уже через 4 ч после начала ингибирования mTORC1, однако через 24 ч маркер аутофагии LC3-II, ассоциированный с мембранами аутофагосом, не выявляется, что говорит о прекращении аутофагии (Рис. 7Г). Следует отметить, что в это время в клетках начинают выявляться крупные вакуоли, напоминающие пищеварительные вакуоли дрожжей, в которых к 72 ч скапливаются LAMP1-позитивный материал. Кроме того, сигнал LAMP1 в виде шаровидных скоплений через 72 ч можно видеть за пределами клетки (Рис. 7Г). Как следует из ИФ-анализа с красителями Mitotracker Green/Orange и с антителами к белку наружной мембраны

митохондрий TOM20, кроме лизосом в вакуолях изолируются и поврежденные митохондрии (Рис. 8А). Согласно ИФ данным, в этих вакуолях можно видеть mTOR, колокализованный с LAMP1, который формирует шаровидные скопления. Одновременно в них попадает ключевой ингибитор mTORC1 белок TSC2 (Рис. 8Б). В стареющих клетках, кроме лизосом, перинуклеарно выявляется фосфорилированный TSC2, однако картин колокализации TSC2 с лизосомами нет (Рис. 8Б). Это может быть одной из причин конститутивной активности перинуклеарно расположенного на лизосомах mTORC1. Поскольку mTORC1, перемещенный вместе с лизосомами в вакуоли, вскоре обнаруживается за пределами клеток, и общее количество mTOR, как следует из данных Вестерн-блоттинга, к 72 ч уменьшается (Рис. 8Б), это может приводить к снижению активности mTORC1.

Поскольку в стареющих клетках аутофагия и митофагия при подавлении mTORC1 не завершаются и не могут разрушать поврежденные митохондрии, жизнеспособность клеток восстанавливается благодаря выявленному нами способу удаления поврежденных органелл. Однако в случае, когда в клетках ингибирован MEK/ERK-путь, поврежденные митохондрии и лизосомы не изолируются в вакуолях, и клетки гибнут (Рис. 8В). Таким образом, когда каноническая аутофагия не работает, активный MEK/ERK необходим для реализации пути спасения опухолевых клеток, связанного с изоляцией и выведением поврежденных органелл за пределы клеток. Также из полученных данных следует, что подавление активности mTORC1 не восстанавливает AMPK-зависимую аутофагию и целостность митохондриального пула, а также жизнеспособность старых клеток при ингибировании MEK/ERK-пути. Таким образом, уязвимость старых клеток к ингибитору MEK/ERK-пути связана не только с активностью регулятора аутофагии mTORC1, но и с пространственным разобщением аутофагосом и лизосом и с перемещением онкогенного Ras в цитоплазму.

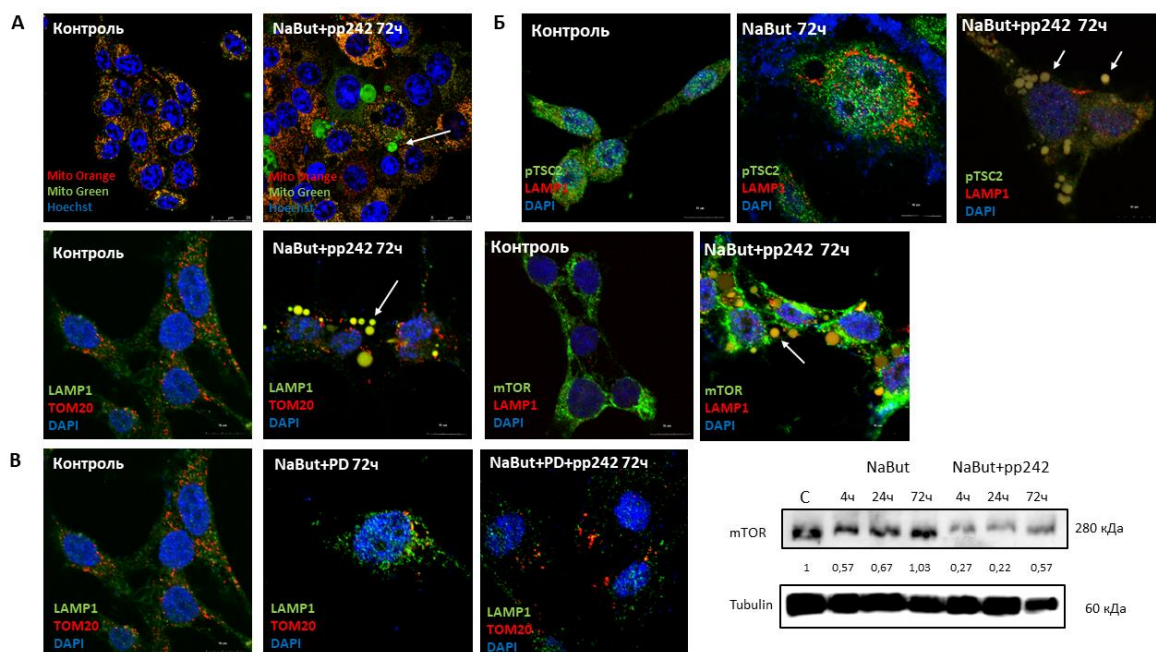


Рис 8. Активный MEK/ERK необходим для реализации пути спасения, связанного с изоляцией поврежденных митохондрий в вакуолях. А. Митохондрии окрашены Mito Green, Mito Orange и AT к белку наружной мембраны митохондрий TOM20. Б. При действии pp242 часть mTOR и pTSC2 направляется в вакуоли и за пределы клеток, приводя к снижению количества mTOR (Вестерн-блоттинг); В. При ингибировании MEK/ERK не происходит изоляции митохондрий в полости.

### 3.6. MEK/ERK-путь необходим для активации аутофагии в ответ на ДНК-повреждение, вызванное облучением

Аутофагия является ключевым механизмом спасения клеток ERas при действии киназного ингибитора PD0325901. Однако, как аутофагия поддерживает жизнеспособность опухолевых клеток после ДНК-повреждающего действия ионизирующего облучения, пока не ясно. Ионизирующее облучение является источником повреждений ДНК, а аутофагия, как показано, может восстанавливать целостность генома (Vessoni et al, 2013). Вовлечение MEK/ERK-пути в поддержание жизнеспособности путем активации аутофагии было изучено после действия рентгеновского облучения в дозе 3 Гр. Ингибирование MEK/ERK-пути после облучения приводит к нарушению терминальных этапов процесса аутофагии через 72 ч, о чем свидетельствует накопление в фагосомах белка p62/SQSTM1, который при нормальном течении аутофагического процесса перемещает убиквитинилированный

поврежденный материал в аутофагосомы и деградирует вместе с содержимым после слияния аутофагосом с лизосомами (Рис. 9). Ингибирование MEK/ERK нарушает процесс аутофагии в облученных клетках и снижает жизнеспособность по данным МТТ, по данным клоногенной выживаемости и пролиферативной активности (Рис. 9).

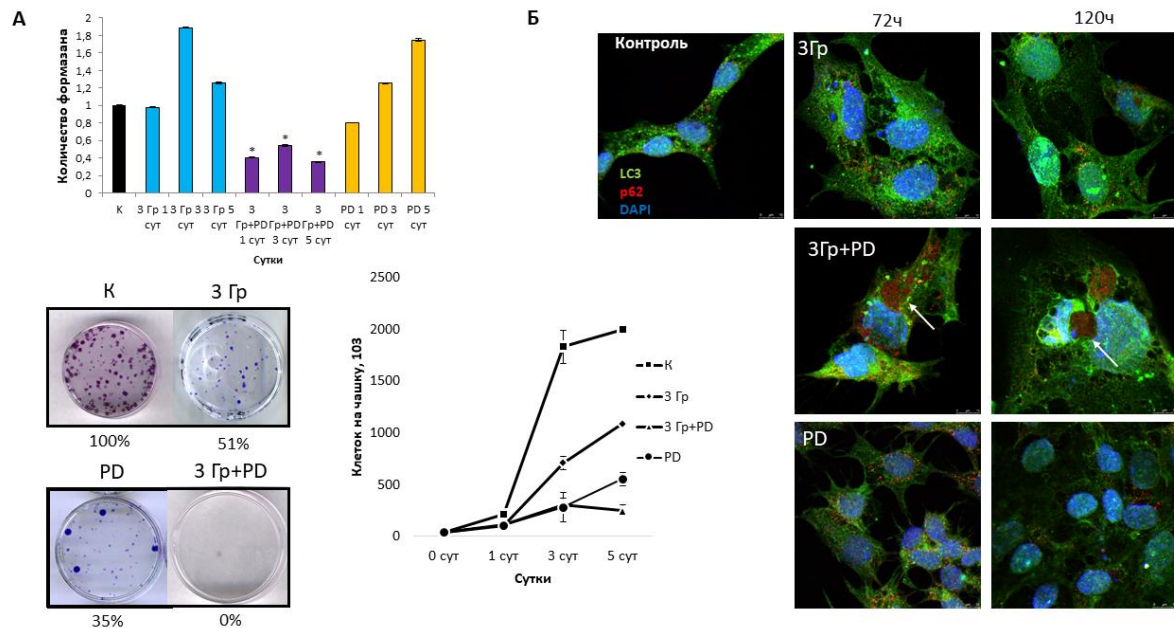


Рис 9. Ингибирование MEK/ERK после облучения нарушает процесс аутофагии, что приводит к снижению жизнеспособности и пролиферативной активности клеток. А. Жизнеспособность, клоногенная выживаемость, кривая роста клеток после облучения и ингибирования MEK/ERK. Указаны средние значения по трем повторам  $\pm$  ошибка среднего. \* $P \leq 0,05$  Б. Накопление p62/SQSTM1 (белые стрелки) в облученных клетках с ингибированным MEK/ERK, свидетельствующее о нарушении процесса аутофагии.

### 3.7. Индукция старения делает KRas-экспрессирующие клетки человека A549 чувствительными к киназному ингибитору MEK/ERK-пути.

Для того, чтобы определить, является ли результат, полученный на клетках ERas, специфичным для этой линии, несущей анти-апоптотический онкогенный HRas, были использованы клетки аденокарциномы легкого человека A549, несущие мутантный онкоген KRas. Контрольные клетки A549, как и ERas, способны восстанавливать жизнеспособность после ингибирования MEK/ERK-пути (Рис. 10А).

Однако ингибирование MEK/ERK-пути в стареющих клетках A549 также приводит к клеточной гибели. И в этом случае наблюдается перемещение Ras с мембран клеток в цитозоль (Рис. 10Б), что позволяет предполагать сходный механизм инактивации антиапоптотических свойств онкогенного Ras при нарушении его правильной локализации.

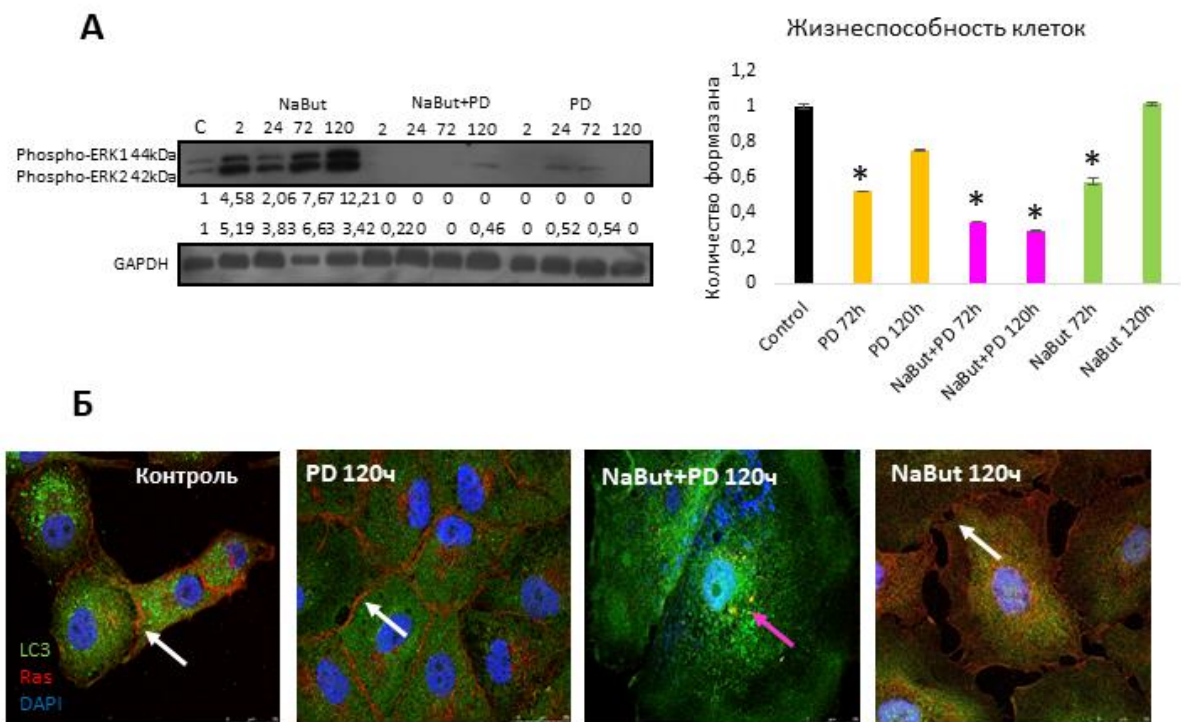


Рис 10. Индукция старения повышает чувствительность клеток аденокарциномы легкого человека A549 к MEK/ERK-ингибитору. А. Фосфорилирование ERK1,2 в клетках и изменение жизнеспособности клеток в течение 120ч действия ингибиторов (Указаны средние значения по трем повторам  $\pm$  ошибка среднего. \* $P \leq 0,05$ ). Б. Локализация Ras в клетках при MEK/ERK-ингибировании, ИФ с АТ к Ras и LC3. Стрелками показан Ras, связанный с мембранами клеток (белая) и в цитозоле (розовая)

#### 4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Аутофагия – это эволюционно консервативный процесс ответа клетки на стресс, нехватку питательных веществ, ростовых факторов и энергии. Аутофагия играет ключевую роль в ответе Ras-экспрессирующих клеток на действие киназного ингибитора MEK/ERK-пути. Толерантность этих клеток связана с активацией AMPK-регулируемой аутофагии, которая элиминирует митохондрии, поврежденные в результате подавления ERK-киназ, и восстанавливает жизнеспособность и пролиферативную

активность клеток. Применение ингибитора HDAC, индуцирующего процесс старения, отменяет толерантность к MEK/ERK ингибитору и вызывает клеточную гибель. Как было показано одновременно с нами, эта комбинация ингибиторов эффективно уничтожает опухолевые клетки человека разного гистогенеза (Yamada et al, 2017). Индуцированные к старению Ras-экспрессирующие клетки не способны элиминировать поврежденные митохондрии в ответ на ингибирование MEK/ERK-пути, так как они не развивают полноценный аутофагический ответ. Преодоление толерантности связано с формированием TASC-компарментов, разобщающих слияние аутофагосом и лизосом в стареющих клетках, а также с перемещением онкогенного Ras с плазматической мембраны в цитозоль, отменяющим его антиапоптотические функции. Недавние исследования показали, что лизосома может функционировать в качестве важного пункта интеграции сигналов в ответ на нехватку питательных веществ и падение уровня энергии. Показано, что лизосомальный комплекс v-ATPase-Ragulator, контролирующий одновременно и AMPK, и mTORC1, осуществляет переключение катаболических и анаболических процессов. Локализация комплексов mTORC1-лизосома по периферии цитоплазмы активирует mTORC1, тогда как перинуклеарная кластеризация ингибирует его. Однако в стареющих клетках перинуклеарная локализация mTORC1 не ведет к его инактивации. Понимание механизмов, контролирующих пространственное положение ключевых компонентов аутофагии при старении, а также органелл, вовлеченных в эти процессы, может дать принципиально новую информацию для разработки подходов уничтожения опухолевых клеток. Используя такой подход, мы обнаружили, что стареющие клетки становятся крайне уязвимыми к действию киназных ингибиторов Ras-пути за счет пространственного разобщения участников аутофагического процесса. Следовательно, применение MEK/ERK-ингибиторов одновременно с индукторами

старения представляет перспективную стратегию элиминации Ras-экспрессирующих опухолевых клеток.

## 5. ВЫВОДЫ

1. В основе толерантности Ras-экспрессирующих опухолевых клеток к действию киназных ингибиторов MEK/ERK-пути лежит активация цитопротективной аутофагии, приводящая к восстановлению митохондриального метаболизма и жизнеспособности клеток в ответ на ингибирование MEK/ERK-пути;
2. Апоптотическая гибель стареющих клеток в ответ на подавление MEK/ERK связана с формированием гипертрофного, гиперсекреторного фенотипа и TASC-компарментов, препятствующих слиянию аутофагосом с лизосомами и уничтожению поврежденных митохондрий, а также с релокализацией онкогенного Ras с мембраны в цитозоль и инактивацией его антиапоптотических функций.
3. MEK/ERK-путь может отвечать в стареющих Ras-экспрессирующих опухолевых клетках за реализацию альтернативного пути удаления поврежденных митохондрий в случае нарушения канонического аутофагического процесса;
4. Толерантность клеток ERas к рентгеновскому облучению связана с активацией цитопротективной аутофагии, а ингибирование активности MEK/ERK-пути киназным ингибитором приводит к подавлению цитопротективной аутофагии и повышению клеточной гибели при действии рентгеновского облучения.

### Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Кочеткова Е.Ю., Быкова Т.В., Зубова С.Г., Поспелова Т.В. Роль MEK/ERK-пути в регуляции HDAC1-индуцированного старения трансформированных эмбриональных фибробластов крысы. Цитология 2014; 56 (8) 581 – 590.
2. Кочеткова Е.Ю., Блинова Г.И., Поспелов В.А., Поспелова Т.В. MEK/ERK-путь необходим для поддержания цитопротективной

- аутофагии после облучения трансформантов *E1A+cHa-Ras*» Цитология 2016, №58 (12): 947 – 954.
3. Goloudina AR, Kochetkova EY, Pospelova TV, Demidov ON. Wip1 phosphatase: between p53 and MAPK kinases pathways. *Oncotarget* 2016; 7 (21): 31563 – 31571. doi: 10.18632/oncotarget.7325.
  4. Кочеткова Е.Ю., Демидов О.Н. Влияние регуляторного каскада Wip1-p53 на ответ клеток при действии бутирата натрия и ингибитора MEK/ERK-сигнального пути. *Цитология* 2017. 59 (4): 285–289.
  5. Targeted elimination of senescent Ras-transformed cells by suppression of MEK/ERK pathway. Elena Y. Kochetkova, Galina I. Blinova, Olga A. Bystrova, Marina G. Martynova, Valery A. Pospelov, Tatiana V. Pospelova. *Aging* 2017, 9 (11): 2352 - 2375. doi: 10.18632/aging.101325.
  6. Suppression of mTORC1 activity in senescent Ras-transformed cells neither restores autophagy nor abrogates apoptotic death caused by inhibition of MEK/ERK kinases. Kochetkova EY, Blinova GI, Bystrova OA, Martynova MG, Pospelov VA, Pospelova TV. *Aging (Albany NY)*. 2018; 10 (11): 3574 - 3589. doi: 10.18632/aging.101686.
  7. V Молодежная конференция по молекулярной и клеточной биологии Института Цитологии РАН. Мини-симпозиум «Молекулярная онкология». Тезисы. Подавление RAS/RAf/MEK/ERK-пути приводит к апоптозу *Ras*-трансформированных клеток, претерпевающих HDACi-индуцированное старение. Кочеткова Е.Ю., Блинова Г.И., Зубова С.Г., Быкова Т.В., Пospelова Т.В.
  8. International Cell Senescence Association (ICSA) Conference (May 16th-19th, 2017, Paris, France). Тезисы. Targeting MEK/ERK pathway decreases expression of senescence markers and results in apoptotic death of HDACi-senescent tumor cells. E. Kochetkova, G. Blinova, M. Martynova, O. Bystrova, V. Pospelov, T. Pospelova.
  9. Клеточная биология: проблемы и перспективы. 2 - 5 октября 2017г. Тезисы. Стареющие *Ras*-трансформированные клетки не реализуют протективную аутофагию при ингибировании MEK/ERK-сигнального пути. Соавторы: Блинова Г.И., Мартынова М.Г., Быстрова О.А., Пospelов В.А., Пospelова Т.В.
  10. VI Молодежная конференция по молекулярной и клеточной биологии Института цитологии РАН, 25–27 апреля 2018 года, Санкт-Петербург. Тезисы. MEK/ERK-путь контролирует аутофагию в стареющих *Ras*-экспрессирующих трансформантах через регуляцию активности лизосом. Кочеткова Е.Ю., Блинова Г.И., Пospelов В.А., Пospelова Т.В.

### Список цитируемой литературы

1. Guo JY, Chen H, Mathew R, Fan J, Strohecker AM, Karsli-Uzunbas G, Kamphorst JJ, Chen G, Lemons JMS, Karantza V, Collier HA, Dipaola RS, Gelinis C et al. *Genes&Development*, 2011; 25 (5): 460-470.

2. Guo JY, Teng X, Laddha SV, Ma S, Van Nostrand SC, Yang Y, Khor S, Chan CS, Rabinowitz JD, White E. *Genes Dev.* 2016; 30(15): 1704 – 1717.
3. Carroll B, Nelson G, Rabanal-Ruiz Y, Kucheryavenko O, Dunhill-Turner NA, Chesterman CC, Zahari Q, Zhang T, Conduit SE, Mitchell CA, Maddoks ODK, Lovat P, von Zglinicki T, et al. *The Journal of Cell Biology.* 2017; 216 (7): 1949 – 1957.
4. Monick MM, Powers LS, Barrett CW, Hinde S, Ashare A, Groskreutz DJ, Nyunoya T, Coleman M, Spitz DR, Hunninghake GW. *J Immunol.* 2008; 180 (11): 7485–7496.
5. Narita M, Young AR, Arakawa S, Samarajiwa SA, Nakashima T, Yoshida S, Hong S, Berry LS, Reichelt S, Ferreira M, Tavaré S, Inoki K, Shimizu S, et al. *Science.* 2011; 332 (6032): 966 – 970.
6. Vessoni AT, Filippi-Chiela EC, Menck CFM, Lenz G. *Cell Death and Differentiation*, 2013; 20 (11): 1444–1454
7. Yamada T, Amann JA, Tanimoto A, Taniguchi H, Shukuya T, Timmers C, Yano S, Shilo K, Carbone DP. *Mol. Cancer Ther.*, 2018; 17 (1): 17 – 25.