

На правах рукописи

ПАРХИТЬКО АНДРЕЙ АЛЕКСАНДРОВИЧ

Роль туберина в регуляции аутофагии на примере туберозного склероза

03.01.03 – молекулярная биология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2012

Работа выполнена в Государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации и в Фокс-Чейзовском онкологическом центре (Филадельфия, США).

Научный руководитель: профессор HENSKE Elizabeth (Хенске Элизабет)

Официальные оппоненты: КОРОБКО Игорь Викторович
доктор биологических наук,
Федеральное государственное бюджетное учреждение
науки Институт биологии гена Российской академии наук,
заведующий лабораторией молекулярной онкогенетики

ОНИЩЕНКО Галина Евгеньевна
доктор биологических наук, профессор
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
«Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»,
заведующая кафедрой клеточной биологии и цитологии

Ведущая организация: Научно-исследовательский институт канцерогенеза
Государственного учреждения Российский онкологический
научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН

Защита состоится «26» октября 2012 года в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 002.037.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биологии гена Российской академии наук по адресу: 119334, Москва, ул. Вавилова, д. 34/5.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук по адресу: 119991, Москва, ул. Вавилова, д. 32.

Автореферат разослан «___» _____ 2012 года.

Ученый секретарь диссертационного совета
канд. фарм. наук

Грабовская Л.С.

Общая характеристика работы

Актуальность темы исследования. В клетке существует две основные системы, которые участвуют в деградации белков - протеосомная и лизосомальная. Лизосомальная система является основным механизмом клеточной деградации долгоживущих внутриклеточных компонентов: белков, жировых накоплений, белковых агрегатов, органелл и т.д. Макроаутофагия (от греческого *auto* – само и *phagos* – поедать, далее – аутофагия) является основным процессом, участвующим в доставке макромолекул и органелл в лизосомы. В процессе аутофагии участки цитоплазмы и дефектные органеллы окружаются мембранами, образуя органеллы, называемые аутофагосомами. Последние впоследствии сливаются с лизосомами, где происходит их деградация. В последнее время было идентифицировано множество генов, участвующих в регуляции различных стадий аутофагии (Autophagy-related genes, или *Atg*). В частности, инактивация генов *Atg5* и *Atg6* (*Beclin1*) приводит к полному прекращению аутофагии в клетке. К настоящему времени накоплено много данных о связи между аутофагией и развитием опухолевых заболеваний, согласно которым в зависимости от типа опухоли, микроокружения и уровня малигнизации аутофагия может как замедлять, так и способствовать развитию опухолей (Roy и др., 2010).

Онкологические заболевания – это комплексные полигенные заболевания, в развитие которых вовлечено множество различных сигнальных каскадов, регулирующих клеточную дифференцировку, пролиферацию и выживаемость (Hanahan et al., 2011). Абсолютное большинство опухолевых заболеваний характеризуется активацией киназного комплекса mTORC1 (мишень для рапамицина у млекопитающих комплекс 1, Mammalian Target Of Rapamycin Complex 1), высококонсервативной серин/треониновой протеинкиназы, регулирующей процессы белкового синтеза, транскрипции, клеточного деления, апоптоза и метаболизма (Laplane et al., 2012). Привлекательной генетической моделью для изучения роли киназного комплекса mTORC1 в регуляции опухолевого роста служит заболевание туберозный склероз (ТС), возникающее в результате инактивирующих мутаций в генах *TSC1* (ген туберозного склероза 1-го типа, Tuberous

Sclerosis Complex gene 1) или *TSC2* (ген туберозного склероза 2-го типа, Tuberous Sclerosis Complex gene 2). Продукты генов *TSC1* и *TSC2*, супрессоры опухолевого роста гамартин и туберин, соответственно, образуют гетеродимер, который, при наличии ростовых факторов, глюкозы, кислорода и аминокислот, фосфорилируется и за счет этого инактивируется, в результате чего происходит активация киназного комплекса mTORC1. Соответственно, мутации в генах *TSC1* или *TSC2* приводят к постоянной и неконтролируемой активации киназного комплекса mTORC1 и, как следствие, к активации клеточной пролиферации и процессов анаболизма.

Настоящая работа посвящена исследованию молекулярных механизмов регуляции аутофагии при инактивации гена *TSC2*, а также изучению роли аутофагии в регуляции биоэнергетических функций клеток с инактивированным геном *TSC2*, их способности к опухолевому росту и регрессии в результате инактивации генов, необходимых для осуществления аутофагии. В работе также описана ранее неизвестная функция белка рабин-8 в регуляции киназного комплекса mTORC1.

Целью диссертационной работы являлся комплексный анализ регуляции аутофагии супрессором опухолевого роста туберином, а также изучение роли аутофагии в регуляции биоэнергетических функций клеток в норме и при развитии опухолей на различных генетических моделях ТС.

В связи с вышеуказанной целью ставились **следующие задачи:**

1. Исследовать влияние гена *TSC2* на процесс аутофагии.
2. Проанализировать, зависит ли регуляция активности аутофагии от активности киназного комплекса mTORC1.
3. Изучить влияние аутофагии на биоэнергетические функции клеток с инактивированным геном *TSC2*, на активацию процессов их клеточной смерти, а также на их способность к опухолевому росту.

4. Проанализировать возможность использования модуляторов аутофагии для лечения опухолей с инактивированным геном *TSC2* в качестве самостоятельных агентов или в комбинации с агентами, используемыми в настоящее время.

5. Изучить влияние белка рабин-8 на регуляцию активности киназного комплекса mTORC1.

Научная новизна работы. В ходе работы впервые прямо продемонстрирована возможность регуляции аутофагии супрессором опухолевого роста *TSC2*; показано, что регуляция аутофагии туберином происходит через регуляцию киназного комплекса mTORC1. Показано влияние дальнейшего ингибирования аутофагии на различные аспекты жизнедеятельности клеток с инактивированным геном *TSC2*, такие как активность митохондрий, синтез АТФ и возможность активации клеточной смерти. Впервые показано, что гены *Atg5* и *Beclin1* необходимы для опухолевого роста, вызванного инактивацией гена *Tsc2*. Также описано ранее неизвестное участие белка рабин-8 в регуляции киназного комплекса mTORC1.

Практическая значимость исследований. В настоящее время отсутствуют эффективные терапевтические средства для лечения опухолевых заболеваний и, в частности, ТС. В данной работе показано, что использование ингибиторов аутофагии замедляет рост опухолей при ТС и, при использовании в комбинации с ингибиторами киназного комплекса mTORC1, усиливает регрессию опухолей. Таким образом, полученные данные позволяют говорить о потенциальной возможности использования ингибиторов аутофагии в качестве терапевтических агентов для лечения ТС.

Апробация результатов диссертационной работы. Результаты диссертационной работы были представлены на международных, конференциях и симпозиумах: Keystone Symposia “Autophagy” (Вистлер, Канада, 2011), Keystone Symposia “Cell Death Pathways: Apoptosis, Autophagy and Necrosis” (Ванкувер, Канада, 2011), The LAM International Research Conference (Цинциннати, США, 2010), Международная конференция “Рецепция и внутриклеточная сигнализация” (Пушино, Россия, 2009), The LAM International Research Conference (Цинциннати, США, 2008), Keystone Symposia “Autophagy In Health and Disease” (Монтерей, США, 2007)

Личный вклад соискателя. Автором самостоятельно выполнен основной объем исследований, проведены обработка и анализ полученных экспериментальных данных, сформулированы основные положения диссертации, составляющие ее новизну и практическую значимость, а также подготовлены материалы публикаций в научных журналах. Подготовка образцов для трансмиссионной электронной микроскопии и их анализ выполнены при участии М. Jarnik (Fox Chase Cancer Center, Филадельфия, США). Анализ дыхательной активности митохондрий выполнен с помощью J. Wu (National Heart Lung and Blood Institute, Бетесда, США). Анализ и сортировка клеток с помощью проточного флуоресцентного цитометра проводились в специализированном отделе (Fox Chase Cancer Center, Филадельфия, США).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 11 печатных работ, из них – 4 статьи и 7 материалов (докладов, стендовых сообщений) конференций

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 129 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов собственных исследований и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы, включающего 199 источников (2 отечественных и 197 зарубежных). Работа содержит 24 рисунка.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Аутофагия регулируется туберин/гамартиновым комплексом

В литературе отсутствуют публикации, в которых была бы прямо продемонстрирована возможность регуляции аутофагии туберин/гамартиновым комплексом. Ранее было косвенно показано, что туберин/гамартиновый комплекс может участвовать в регуляции аутофагии через регуляцию активности киназного комплекса mTORC1 (Alexander и др., 2010), однако существует множество процессов, регулируемых туберин/гамартиновым комплексом независимо от активности mTORC1, которые могут оказывать влияние на активность аутофагии (Neuman и др., 2011). Для выяснения роли туберина в регуляции аутофагии мы использовали мышинные эмбриональные фибробласты с инактивацией гена *Tsc2*, кодирующего белок туберин, которые также имеют нокаут по гену *p53* для предотвращения клеточного старения. В качестве контроля использовали мышинные эмбриональные фибробласты с нокаутом по гену *p53*, но имеющие функциональный ген *Tsc2* (данные клеточные линии были получены из эмбрионов от одного скрещивания и культивировались одинаковое количество пассажей). Клетки *Tsc2*^{+/+} (**Рис. 1**, дорожка 1) и *Tsc2*^{-/-} (**Рис. 1**, дорожка 2) инкубировали в среде, содержащей ростовые факторы, в течение 90 мин. Инактивация гена *Tsc2* приводит к накоплению фосфорилированной (по Ser235/Ser236) формы белка S6, снижению уровня белка LC3-II и накоплению белка p62, что свидетельствует об активации киназного комплекса mTORC1 и снижении уровня аутофагии.

Для подтверждения вывода о снижении уровня аутофагии, полученного с помощью иммуноблоттинга белков LC3-II и p62, мы использовали трансмиссионную электронную микроскопию. *Tsc2*^{+/+} и *Tsc2*^{-/-} мышинные эмбриональные фибробласты инкубировали в течение 90 мин в среде, содержащей ростовые факторы, фиксировали, подвергали микродиссекции и анализировали с помощью трансмиссионной электронной микроскопии (подготовку образцов

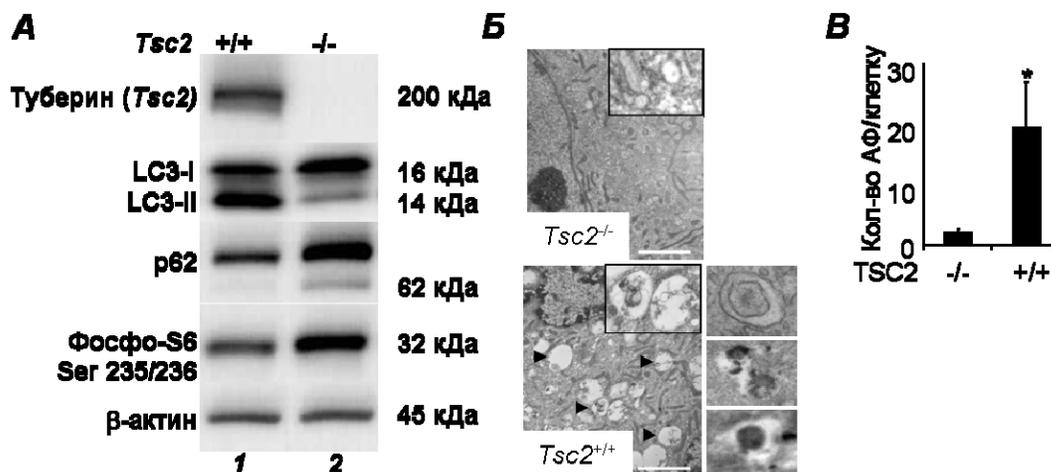


Рис. 1. Инактивация гена *Tsc2* снижает уровень аутофагии. *Tsc2*^{+/+} (дорожка 1) и *Tsc2*^{-/-} (дорожка 2) мышинные эмбриональные фибробласты инкубировали в среде, содержащей ростовые факторы в течение 90 мин. (А) Уровень аутофагии анализировали по уровню накопления белков LC3-II и p62 (по данным иммуноблоттинга с антителами к этим белкам). Активность mTORC1 анализировали с помощью иммуноблоттинга с фосфоспецифическими антителами против S6 (Ser235/Ser236). Белок p62 подвергается различным посттрансляционным модификациям, что приводит к появлению при иммуноблоттинге второй полосы с более высокой мол. массой. (Б) Количество аутофагосом анализировали с помощью трансмиссионной электронной микроскопии. Увеличение 9300х. Длина отрезка соответствует 2 мк. На врезках представлены аутофагосомы, находящиеся на разных этапах формирования. (В) Количество аутофагосом (АФ) на клетку *Tsc2*^{-/-} и *Tsc2*^{+/+} (посчитано слепым методом). * $p < 0.05$.

выполнял М. Jarnik в отделе электронной микроскопии Fox Chase Cancer Center, США) (Рис. 1Б).

Инактивация гена *Tsc2* приводила к значимому снижению количества аутофагосом в клетке (Рис. 1В) ($p < 0.05$), что подтверждает данные иммуноблоттинга по определению содержания белков LC3-II и p62.

Так как рост опухолей происходит в условиях биоэнергетического стресса (недостаток питательных веществ, кислорода и ростовых факторов), мы создали условия биоэнергетического стресса *in vivo*, используя *Tsc2*^{-/-} клетки ELT3 (клетки, полученные из лейомиомы крыс Экера, с подтвержденной инактивацией гена *Tsc2*), стабильно трансфицированные контрольным вектором (ELT3 V3) или вектором, экспрессирующим туберин (ELT3 T3). 2×10^6 клеток ELT3 V3 или ELT3 T3 инъецировали подкожно иммунодефицитным *scid* мышам. Мышей подвергали эвтаназии после достижения опухолями размера 10 x 10 мм. Также как и в культуре клеток, инактивация гена *Tsc2*

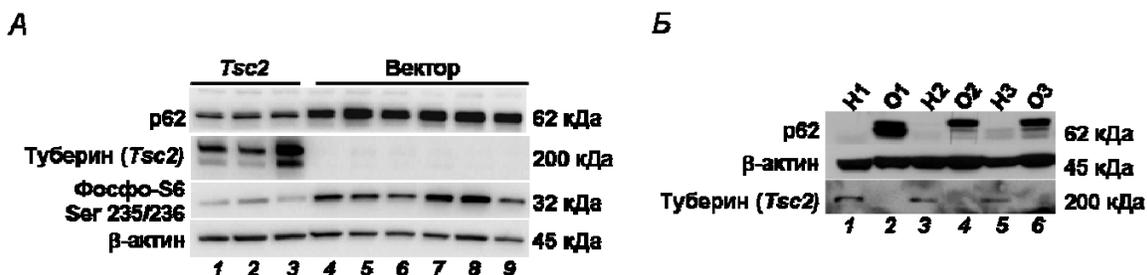


Рис. 2. Инактивация гена Tsc2 снижает активность аутофагии в условиях биоэнергетического стресса *in vivo*. (А) 2×10^6 клеток ELT3 (с инактивированным геном Tsc2), стабильно трансфицированных контрольным вектором (ELT3 V3) (Вектор, дорожки 4-9), или вектором, экспрессирующим туберин (ELT3 T3) (Tsc2, дорожки 1-3), инъецировали подкожно иммунодефицитным scid мышам. Мышей подвергали эвтаназии после достижения опухолями размера 10 x 10 мм. Ре-экспрессия туберина в клетках ELT3 T3 (дорожки 1-3) приводила к увеличению уровня аутофагии по сравнению с клетками ELT3 V3 с ре-экспрессией пустого вектора (дорожки 4-9). Активность аутофагии анализировали по уровню накопления белка p62 с помощью иммуноблоттинга с соответствующими антителами. (Б) Уровень аутофагии в почечных ангиомиолипомах человека по сравнению с окружающей нормальной почечной тканью анализировали по уровню накопления белка p62. Уровень туберина оценивали методом иммуноблоттинга со специфическими антителами. O1, O2, O3 – образцы почечных ангиомиолипом трех пациентов; N1, N2, N3 – образцы соответствующих нормальных почечных тканей.

приводила к снижению уровня аутофагии в условиях биоэнергетического стресса *in vivo*, который выявляли по более высокому уровню накопления белка p62 (Рис. 2А).

Для определения активности аутофагии в опухолевых образцах от пациентов с ТС по сравнению с нормальной окружающей тканью мы сравнивали уровни аутофагии в образцах почечных ангиомиолипом с образцами из нормальной почечной ткани от тех же пациентов. Потеря экспрессии туберина в образцах почечных ангиомиолипом (Рис. 2Б, дорожки 2,4,6), по сравнению с нормальной почечной тканью (Рис. 2Б, дорожки 1,3,5) приводила к значительному накоплению белка p62, что свидетельствует о значительном снижении уровня аутофагии.

2. Регуляция аутофагии туберин/гамартиновым комплексом происходит через регуляцию mTORC1.

На этом этапе стояла задача выяснить, является ли регуляция аутофагии туберином mTORC1-зависимым или mTORC1-независимым процессом (неканонической функцией). Для этой цели мы

использовали ингибитор киназного комплекса mTORC1 – рапамицин. Клетки *Tsc2*^{+/+} (Рис. 3, дорожки 1,2) и *Tsc2*^{-/-} (Рис. 3, дорожки 3,4) инкубировали в присутствии ДМСО (контроль) (Рис. 3, дорожки 1,3) или 20 нМ рапамицина (Рис. 3, дорожки 2,4). Инкубация клеток с рапамицином приводила к полной инактивации киназного комплекса mTORC1 и выравниванию уровня белка p62 в клетках *Tsc2*^{+/+} (дорожка 2) и *Tsc2*^{-/-} (дорожки 4). Так как белок LC3-II может служить индикатором активации аутофагии только после относительно непродолжительного времени (4-6 ч), после чего начинается его деградация на внутренней мембране аутолизосомы (Mizushima et al. 2010), для анализа аутофагии использовали только оценку уровня белка p62. Эти результаты свидетельствуют о регуляции аутофагии туберин/гамартиновым комплексом, опосредованной регуляцией киназного комплекса mTORC1.

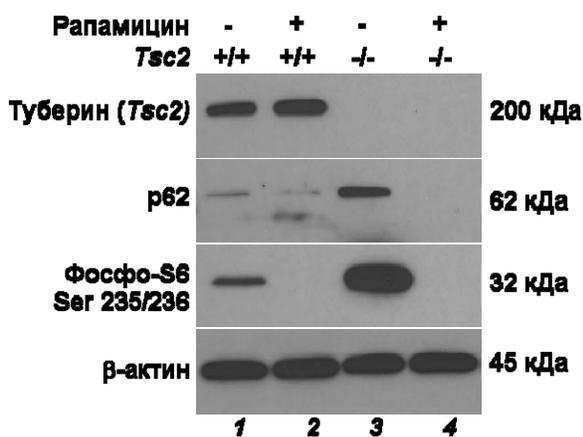


Рис. 3. Инактивация гена *Tsc2* снижает активность аутофагии в результате активации mTORC1. *Tsc2*^{+/+} (дорожки 1,2) и *Tsc2*^{-/-} (дорожки 3,4) мышинные эмбриональные фибробласты выдерживали в среде, содержащей ростовые факторы в течение 24 ч в присутствии ДМСО (дорожки 1,3) или рапамицина (дорожки 2,4). Уровень аутофагии анализировали по уровню накопления белка p62.

3. Инактивация гена *Atg5* в клетках с инактивированным геном *Tsc2* приводит к дальнейшему снижению уровня аутофагии, ингибированию синтеза АТФ, активации апоптоза в условиях стресса, а также к массовой клеточной гибели и образованию некротических зон при росте подкожных опухолей в иммунодефицитных мышах.

Так как основные функции аутофагии – обеспечение клетки субстратами для синтеза АТФ в условиях стресса и селективная деградация стареющих митохондрий, клетки в условиях недостатка питательных веществ используют аутофагию для предотвращения клеточной смерти (Rabinowitz et al. 2011). Снижение уровня аутофагии в результате инактивации гена *Tsc2* может свидетельствовать

о двух возможных сценариях: или клетки с инактивацией гена *Tsc2* используют в условиях стресса альтернативные источники энергии, и они становятся независимыми от активности аутофагии, или они становятся “гиперчувствительными” к ингибированию аутофагии в условиях стресса. Для ответа на этот вопрос мы проводили серию экспериментов с ингибированием аутофагии в клетках *Tsc2*^{-/-} различными способами: с использованием shРНК (short hairpin, или короткошпилечная РНК, связывающаяся с комплементарной последовательностью в мРНК гена, что вызывает деградацию последней), или путем инактивации одного аллеля гена *Beclin1* (раздел 4), или используя хлорохин (раздел 5).

Для того чтобы определить, необходима ли аутофагия для клеток с инактивацией гена *Tsc2*, мы использовали *Atg5* shРНК, shРНК против гена *Atg5*, который абсолютно необходим для процесса аутофагии и инактивация которого приводит к полному прекращению образования аутофагосом. В качестве контроля использовали shРНК, не имеющую комплементарной последовательности в геномных мРНК человека. Клетки *Tsc2*^{-/-} инфицировали лентивирусными частицами, содержащими контрольную или *Atg5* shРНК, и после инкубации с лентивирусными частицами в течение 48 ч клеткам добавляли среду, содержащую 3 мкг/мл пурамицина для отрицательной селекции клеток, не экспрессирующих shРНК. Для контроля возможности неспецифических эффектов использовали две *Atg5* shРНК (1 и 2), связывающиеся с различными участками в мРНК гена *Atg5*. Инфицирование клеток лентивирусными частицами, содержащими *Atg5* shРНК (Рис. 4А, дорожки 2,3), как и ожидалось, приводило к значительному снижению уровня ковалентного димера *Atg5-Atg12* по сравнению с клетками, инфицированными лентивирусными частицами, содержащими контрольную shРНК (Рис. 4А, дорожка 1), а также к практически полному отсутствию белка LC3-II. Эти результаты свидетельствуют о том, что в данных клетках не происходит образование аутофагосом, в отличие от клеток, инфицированных лентивирусными частицами, содержащими контрольную shРНК (в которых аутофагия ингибирована по сравнению с контрольными клетками, но может быть активирована в условиях стресса). Инфицирование клеток лентивирусными частицами,

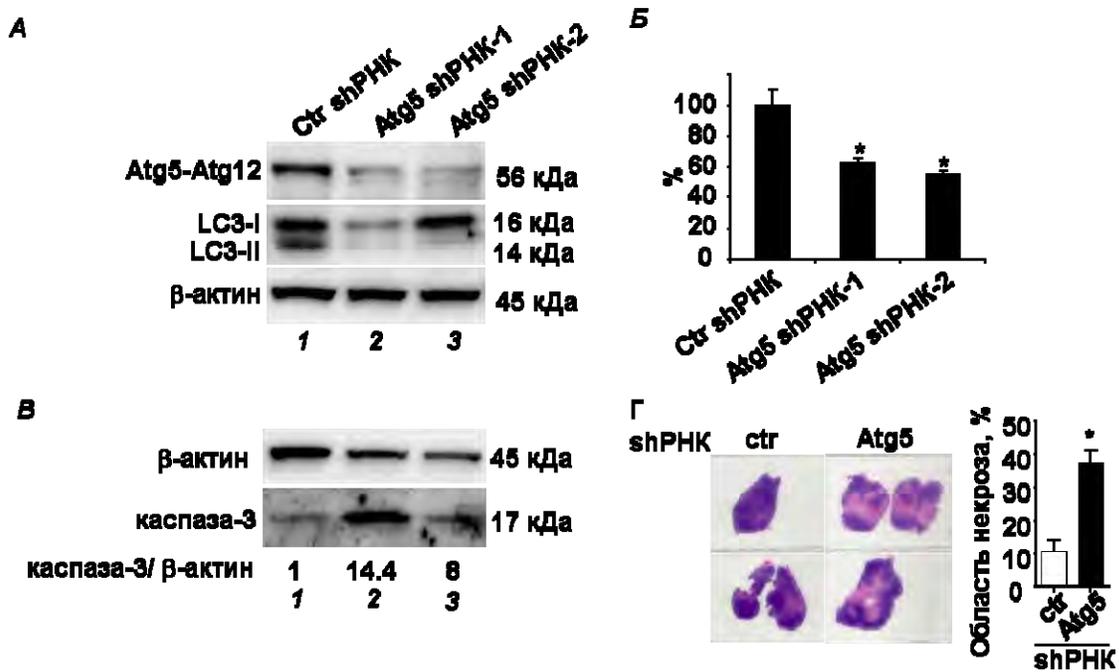


Рис. 4. Ингибирование экспрессии *Atg5* в клетках *Tsc2*^{-/-} приводит к снижению аутофагии, синтеза АТФ и активации клеточной смерти в условиях стресса. **А.** *Tsc2*^{-/-}, инфицированные контрольной (дорожка 1) и *Atg5* shRNA 1 и 2 (дорожки 2,3), инкубировали в среде, содержащей ростовые факторы в течение 24 ч. Уровень белка *Atg5* и LC3-II определяли с помощью иммуноблоттинга. **Б.** Уровень АТФ определяли с помощью набора ATPlite через 24 ч по уровню люминисценции. Уровень АТФ в клетках, инфицированных контрольной shRNA, принимали за 100%. * $p < 0.05$. **В.** *Tsc2*^{-/-} мышинные эмбриональные фибробласты, инфицированные контрольной (дорожка 1) и *Atg5* shRNA 1 и 2 (дорожки 2,3), инкубировали в среде, не содержащей ростовых факторов и глутамина, при пониженной концентрации глюкозы (5мМ). Уровень активации клеточной смерти определяли с помощью иммуноблоттинга с антителами против активированной формы каспазы-3. Уровень последней измеряли денситометрически (используя программу ImageJ) и нормализовали к уровню β-актина. Уровень активации клеточной смерти в контрольных клетках принят за 1. (цифры указаны для наглядности). **Г.** Слева: После подкожной инъекции голым иммунодефицитным мышам CD-1 клеток *Tsc2*^{-/-} с контрольной и *Atg5* shRNA 3 и образования опухолей делали срезы через центр опухоли и окрашивали их с помощью гематоксилин-эозина. Справа: сравнение размеров области некроза при инфицировании контрольной и *Atg5* shRNA (в % от общей площади опухоли). * $p < 0.05$.

содержащими *Atg5* shRNA, приводило также к значительному снижению уровня АТФ по сравнению с контрольными клетками (**Рис. 4Б**), но не активировало клеточной смерти (данные не показаны). Уровень АТФ был нормализован по отношению к количеству живых клеток; следовательно, можно предположить, что снижение уровня АТФ происходило не в результате снижения уровня пролиферации или активации процессов клеточной смерти, а в результате нарушения клеточного

метаболизма. Для оценки влияния аутофагии на процессы клеточной смерти в условиях стресса клетки *Tsc2*^{-/-}, инфицированные контрольной или *Atg5* shРНК, выращивали в среде, не содержащей ростовых факторов, L-глутамина и содержащей 5 мМ глюкозу (по сравнению с 25 мМ в стандартной среде) в течение 16 ч. Уровень клеточной смерти измеряли по накоплению активированной формы каспазы-3. Инфицирование клеток лентивирусными частицами, содержащими *Atg5* shРНК 1 или 2, приводило к 14.4- и 8-кратной активации клеточной смерти в условиях стресса, соответственно (**Рис. 4В**, дорожки 2,3) по сравнению с контрольными клетками (**Рис. 4В**, дорожка 1) *in vitro*.

Для оценки влияния аутофагии на рост опухолей с инактивированным геном *Tsc2* мышинные эмбриональные фибробласты *Tsc2*^{-/-} инфицировали лентивирусными частицами, содержащими контрольную или *Atg5* shРНК 3, а также ген *GFP* (кодирующий зеленый флуоресцентный белок, Green Fluorescent Protein) для положительной селекции инфицированных клеток. Клетки выращивали в среде, содержащей ростовые факторы, в течение 48 ч, после чего их подвергали сортировке на GFP-позитивную и негативную фракции. Данную процедуру повторяли 5 раз для получения культуры клеток, содержащей более 95% GFP-позитивных клеток. 2.5×10^6 клеток *Tsc2*^{-/-}, инфицированных контрольной и *Atg5* shРНК, подкожно вводили иммунодефицитным *nude* мышам. После достижения опухолями размеров ~15 x 15 мм мышей подвергали эвтаназии, опухоли фиксировали в растворе формалина и окрашивали с помощью гематоксилин-эозина (**Рис. 4Г**). Зоны некроза окрашиваются слабым розовым цветом, опухолевая ткань окрашивается фиолетовым цветом. При подсчете области некроза по сравнению с нормальной опухолевой тканью оказалось, что ингибирование экспрессии *Atg5* в клетках *Tsc2*^{-/-} приводило к 4-кратному увеличению зоны некроза.

4. Инактивация одного аллеля гена *Beclin1* приводит к снижению уровня образования цистаденом в мышах, гетерозиготных по гену *Tsc2*.

Для дальнейшего исследования роли аутофагии при развитии опухолей мы использовали преคลินิกую модель ТС – мышей, гетерозиготных по гену *Tsc2* линии C57Bl/6, которых скрещивали с мышами, гетерозиготными по гену *Beclin1* линии C57Bl/6. У мышей, гетерозиготных по гену *Tsc2*, к 10-му месяцу жизни развиваются только почечные цистаденомы, тогда как печеночные гемангиомы и гемангиосаркомы развиваются значительно позже (Onda et al. 1999). Потеря одного аллеля гена *Beclin1* приводит к снижению уровня активности аутофагии, а также снижает активацию аутофагии в условиях

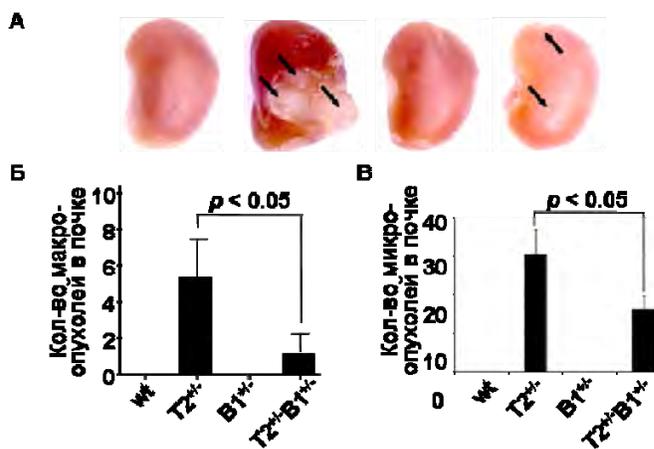


Рис. 5. Инактивация одного аллеля гена *Beclin1* приводит к ингибированию онкогенеза в *Tsc2*^{+/−} мышах. А. Фотографии почек исследуемых мышей. Стрелками указаны цистаденомы. **Б и В.** Индекс макроскопических и микроскопических цистаденом, соответственно, у мышей с генотипом *Tsc2*^{+/+}*Beclin1*^{+/+} (wt), *Tsc2*^{+/−}*Beclin1*^{+/+} (*T2*^{+/−}), *Tsc2*^{+/+}*Beclin1*^{+/−} (*B1*^{+/−}) и *Tsc2*^{+/−}*Beclin1*^{+/−} (*T2*^{+/−}*B1*^{+/−}) на 10-м месяце жизни, подсчитанный независимо для каждой почки (4 мыши в группе) слепым методом по протоколу (Pollizzi et al., 2009).

стресса (Karantza-Wadsworth et al. 2007). Мышей *Tsc2*^{+/−} и *Beclin1*^{+/−} скрещивали, и образующееся потомство (*Tsc2*^{+/+}*Beclin1*^{+/+}, *Tsc2*^{+/−}*Beclin1*^{+/+}, *Tsc2*^{+/+}*Beclin1*^{+/−} и *Tsc2*^{+/−}*Beclin1*^{+/−}) подвергали эвтаназии в возрасте 10 месяцев, извлекали почки и подсчитывали количество почечных цистаденом (Рис. 5А). При подсчете количества опухолей на поверхности почек (макроскопические опухоли) обнаружили, что у *Tsc2*^{+/−}*Beclin1*^{+/+} мышей развивается в 5 раз больше цистаденом, чем у *Tsc2*^{+/−}*Beclin1*^{+/−} (Рис. 5Б). После подсчета макроскопических опухолей почки разрезали в поперечном направлении на образцы шириной 1 мм, заливали их парафином и приготавливали срезы, которые окрашивали гематоксилин-эозином. При подсчете цистаденом на срезах, окрашенных гематоксилин-эозином, обнаружили, что у *Tsc2*^{+/−}*Beclin1*^{+/+} мышей развивается в 2 раза больше цистаденом, чем у мышей *Tsc2*^{+/−}*Beclin1*^{+/−}

(микроскопические опухоли) (Рис. 5В). Эти результаты позволяют предположить, что инактивация одного аллеля гена *Beclin1* приводит к снижению уровня образования цистаденом у мышей, гетерозиготных по гену *Tsc2*, в результате ингибирования аутофагии, что косвенно подтверждает наши данные, полученные на подкожных опухолях с инактивацией гена *Atg5*. Тем не менее, *Beclin1* может регулировать и другие клеточные процессы, например процессы эндоцитоза (Backer et al. 2008), поэтому ингибирование образования цистаденом может происходить также в результате ингибирования процессов, не связанных с аутофагией. Поскольку размеры цистаденом были малы, мы не могли их проанализировать с помощью иммуноблоттинга, чтобы показать, что в результате инактивации одного аллеля *Beclin1* происходит дальнейшее ингибирование аутофагии в клетках цистаденом.

5. Фармакологическое ингибирование аутофагии с использованием хлорохина замедляет развитие почечных цистаденом в мышцах, гетерозиготных по гену *Tsc2*

Основываясь на предыдущих результатах, мы предположили, что фармакологическое ингибирование аутофагии будет также приводить к ингибированию опухолевого роста. В качестве ингибитора аутофагии использовали хлорохин, так как он

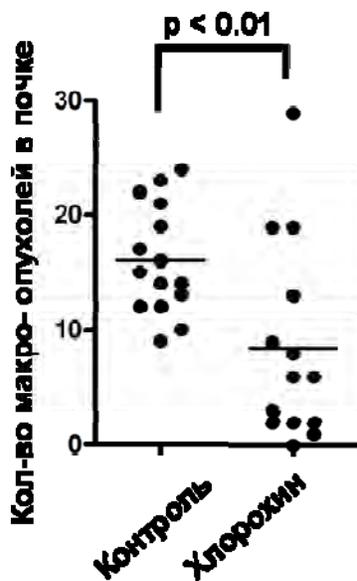


Рис. 6. Ингибитор аутофагии, хлорохин, замедляет развитие почечных цистаденом в мышцах, гетерозиготных по гену *Tsc2*. Мышей гетерозиготных по гену *Tsc2* линии А/Ж разделяли случайным образом на 2 группы, одна из которых получала физиологический раствор, а другая – раствор хлорохина, 50 мг/кг 5 дней в неделю внутривентриально в течение 4 месяцев, начиная с 1ого месяца жизни.

блокирует конечные стадии образования аутолизосом и в течение многих лет используется в клинике в качестве противомаларийного препарата (Solomon et al., 2009). В качестве модели ТС мы использовали мышей линии А/Ж, гетерозиготных по гену *Tsc* (*Tsc2*^{+/-}), которые характеризуются развитием значительного количества почечных цистаденом к 5 месяцам жизни. *Tsc2*^{+/-} мышей

разделяли случайным образом на две группы, одна из которых получала физиологический раствор, а другая – раствор хлорохина, 50 мг/кг 5 дней в неделю внутривнутрибрюшинно в течение 4 месяцев, начиная с первого месяца жизни. После окончания лечения мышей подвергали эвтаназии в возрасте 5 месяцев, извлекали почки и фиксировали их в 10% растворе формалина в течение 24 ч, а затем переносили в 70% раствор этанола. Количество макроскопических опухолей на поверхности почки подсчитывали под световым микроскопом (Рис. 6). Использование хлорохина приводило к значительному замедлению развития цистаденом.

6. Одновременное ингибирование киназного комплекса mTORC1 (с использованием рапамицина) и аутофагии (с использованием хлорохина) у иммунодефицитных мышей и мышей, гетерозиготных по гену *Tsc2*, приводит к более выраженному уменьшению подкожных опухолей и замедлению развития почечных цистаденом по сравнению с мышами, получавшими только рапамицин или хлорохин.

Как уже отмечалось, ингибиторы киназного комплекса mTORC1, рапамицин и его аналоги, находятся на различных стадиях клинических испытаний при ТС и множестве других опухолевых заболеваний, связанных с активацией киназного комплекса mTORC1, однако эффективность этих ингибиторов оказывается, как правило, невысока. Наши результаты свидетельствуют о том, что в клетках с инактивированным геном *Tsc2* рапамицин активирует аутофагию (Рис. 3). Мы предположили, что невысокая эффективность рапамицина связана с его способностью активировать аутофагию, позволяя клеткам выживать в условиях биоэнергетического стресса. Опираясь на эти данные, мы предположили, что совместное ингибирование mTORC1 рапамицином и аутофагии хлорохином будет более эффективным в ингибировании роста подкожных опухолей у иммунодефицитных мышей и развития почечных цистаденом у мышей, гетерозиготных по гену *Tsc2*, чем действие этих ингибиторов поодиночке. Клетки *Tsc2*^{-/-} вводили подкожно иммунодефицитным *scid* мышам. После достижения опухолями размеров ~10 x 10 мм мышей разделяли случайным образом на две группы, одна из которых получала в/б рапамицин (6 мг/кг), а

другая – и рапамицин (6 мг/кг) совместно, и хлорохин (50 мг/кг) ежедневно в течение 15 дней (Рис. 7А). В группе мышей с одновременным ингибированием mTORC1 и аутофагии происходило более существенное уменьшение размеров опухолей по сравнению с мышами, получавшими только рапамицин. В группе мышей, получавших контрольный раствор или хлорохин, рост опухолей продолжался, поэтому эти мыши были исключены из анализа. Для оценки эффективности двойного ингибирования mTORC1 и аутофагии мы использовали также мышей, гетерозиготных по гену *Tsc2* линии A/J, у которых развивается значительное количество почечных цистаденом к 5 месяцам

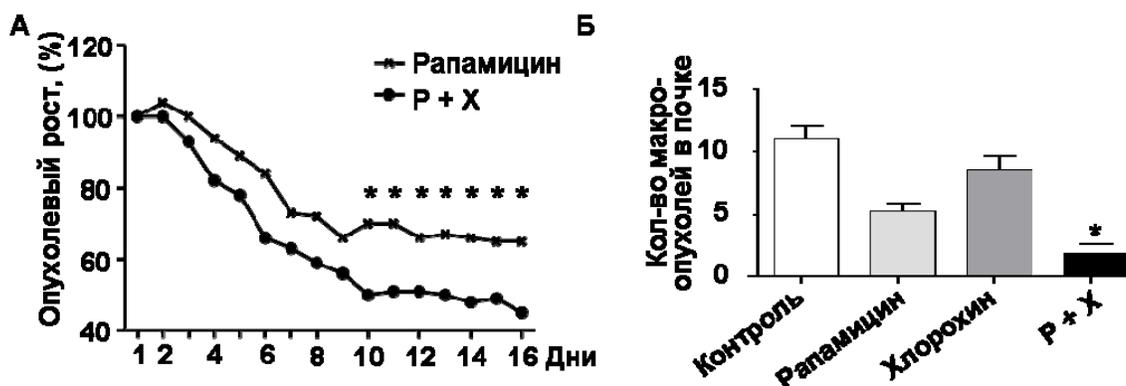


Рис. 7. Совместное действие киназного комплекса mTORC1 и аутофагии в регуляции опухолевого роста. (А). Клетки *Tsc2*^{-/-} ELT3 инъецировали подкожно иммунодефицитным *scid* мышам. После того, как опухоли достигали размеров 10 x 10 мм (длина x ширина), их размер принимали за 100% и мышей разделяли случайным образом на 2 группы (8 мышей в группе), одна из которых получала рапамицин (6 мг/кг) в/б, а другая (P + X) – раствор и рапамицина (6 мг/кг), и хлорохина (50 мг/кг) в/б в течение 15 дней. **(Б)** Индекс макроскопических цистаденом у мышей линии A/J, гетерозиготных по гену *Tsc2* на 5-м месяце жизни, подсчитанный слепым методом независимо для каждой почки. Мышей разделяли случайным образом на 4 группы (8 мышей в группе), первая группа получала в/б физиологический раствор, вторая – раствор хлорохина (50 мг/кг) 5 дней в неделю, третья - рапамицин (6 мг/кг) 3 дня в неделю, а четвертая (P + X) – раствор и рапамицина, и хлорохина в течение 1 месяца, начиная с четвертого месяца жизни. * $p < 0.05$.

жизни. Этим мышам разделяли случайным образом на 4 группы. Первая группа получала в/б физиологический раствор, вторая – хлорохин (50 мг/кг) 5 дней в неделю, третья - рапамицин (6 мг/кг) 3 дня в неделю, а четвертая – и рапамицин, и хлорохин в течение 1 месяца, начиная с четвертого месяца жизни. После окончания лечения мышам подвергали эвтаназии, извлекали почки

и фиксировали в 10% растворе формалина в течение 24 ч, после чего почки переносили в 70% раствор этанола. Количество макроскопических опухолей на поверхности почки подсчитывали под световым микроскопом (Рис. 7Б). В группе мышей с одновременным ингибированием mTORC1 и аутофагии происходило более выраженное замедление развития почечных цистаденом по сравнению с мышами, получавшими только рапамицин или хлорохин ($p < 0.05$).

7. Рабин-8 ингибирует активность киназного комплекса mTORC1, взаимодействуя с ГТФ-азой Rheb и киназным комплексом mTORC1.

Наши результаты свидетельствуют о регуляции аутофагии туберин/гамартиновым комплексом через регуляцию киназного комплекса mTORC1 (Рис. 3). Известно, что туберин/гамартиновый комплекс регулирует активность киназного комплекса mTORC1 через регуляцию активности ГТФ-азы Rheb (гомолог белка Ras - Ras Homolog Enriched in Brain). Несмотря на то, что на данный момент известно очень многое о регуляции туберин/гамартинового комплекса, регуляция ГТФ-азы Rheb изучена мало. Так как спектр функций (образование первичной реснички, цитоплазматический транспорт белков), которые регулируются белками рабин-8 и Rheb,

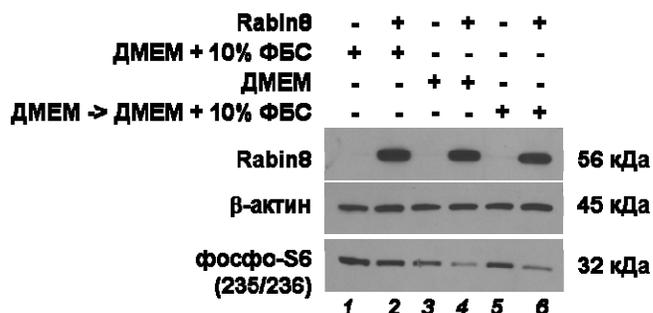


Рис. 8. Сверхэкспрессия рабина-8 в культуре клеток HEK293 снижает активность киназного комплекса mTORC1. Клетки трансфицировали контрольным вектором pcDNA3.1 (дорожки 1,3,5) или вектором, экспрессирующим рабин-8 (дорожки 2,4,6). Активность mTORC1 анализировали по уровню фосфорилирования рибосомного белка S6 с помощью иммуноблотинга с фосфоспецифическими антителами против S6 (Ser235/Ser236) в среде, содержащей ростовые факторы (дорожки 1,2), в отсутствие ростовых факторов (дорожки 3,4) и при стимуляции клеток, выдержанных в течение 24 ч в среде без ростовых факторов, средой с ростовыми факторами в течение 15 мин (дорожки 5,6). Уровень рабина-8 оценивали методом иммуноблотинга со специфическими антителами.

перекрывается и нарушение регуляции обоих приводит к развитию цилиопатий, мы предположили, что существует функциональная связь между рабин-8 и регуляцией ГТФ-азой Rheb киназного комплекса mTORC1 и аутофагии. Роль белка рабин-8 в регуляции активности комплекса mTORC1

мы выясняли с использованием клеточной линии НЕК293. Клетки трансфицировали контрольным вектором рсDNA3.1 (Рис. 8, дорожки 1,3,5) или вектором, экспрессирующим рабин-8 (Рис. 8, дорожки 2,4,6). В случае контрольного вектора при наличии в среде ростовых факторов (Рис. 8, дорожка 1) комплекс mTORC1 активирован, о чем свидетельствует уровень фосфорилирования рибосомного белка S6. В отсутствие ростовых факторов (Рис. 8, дорожка 3) происходит некоторое ингибирование киназной активности mTORC1, а последующая кратковременная стимуляция клеток, выдержанных в таких условиях, средой, содержащей ростовые факторы (Рис. 8, дорожка 5), приводит к полной реактивации комплекса mTORC1. Высокий уровень белка рабин-8, обусловленный трансфекцией клеток вектором, экспрессирующим рабин-8, не влиял на активность киназного комплекса mTORC1 (Рис. 8, дорожка 2) в среде, содержащей ростовые факторы, но приводил к снижению активности mTORC1 в их отсутствие (Рис. 8, дорожка 4) и при реактивации этого комплекса средой, содержащей ростовые факторы (Рис. 8, дорожка 6).

Как следует из полученных нами результатов, рабин-8 является негативным регулятором киназного комплекса mTORC1. Возможность взаимодействия между рабином-8, Rheb и mTOR мы изучали при помощи трансфекции культуры клеток НЕК293 двумя векторами, экспрессирующими рабин-8 и слитый белок Мус-Rheb (Рис 9, дорожки 2–4), или одновременно контрольными векторами рсDNA3.1 и рCMVTag3A (Рис 9, дорожка 1) в среде, содержащей (Рис 9, дорожки 1,2)

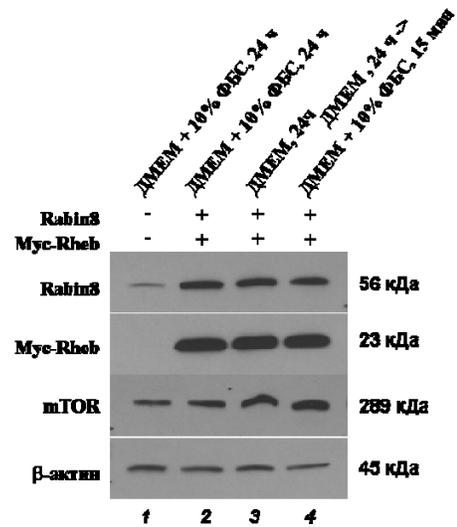


Рис. 9. Оверэкспрессия белков рабин-8 и Rheb в клетках НЕК293 для последующей коиммунопреципитации. Уровень экспрессии белков рабин-8, Мус-Rheb и mTOR после котрансфекции клеток контрольными векторами рсDNA3.1 и рCMVTag3A (дорожка 1) или векторами, экспрессирующими рабин-8 и слитый белок Мус-Rheb (дорожки 2–4), в среде с ростовыми факторами (дорожки 1,2), без ростовых факторов (дорожка 3) и при стимуляции клеток, выдержанных в течение 24 ч в среде без ростовых факторов, средой с ростовыми факторами в течение 15 мин (дорожка 4).

или не содержащей ростовые факторы (Рис 9, дорожка 3), а также при последующей кратковременной стимуляции клеток, выдержанных в течение 24 ч без ростовых факторов, средой, содержащей ростовые факторы (Рис 9, дорожка 4).

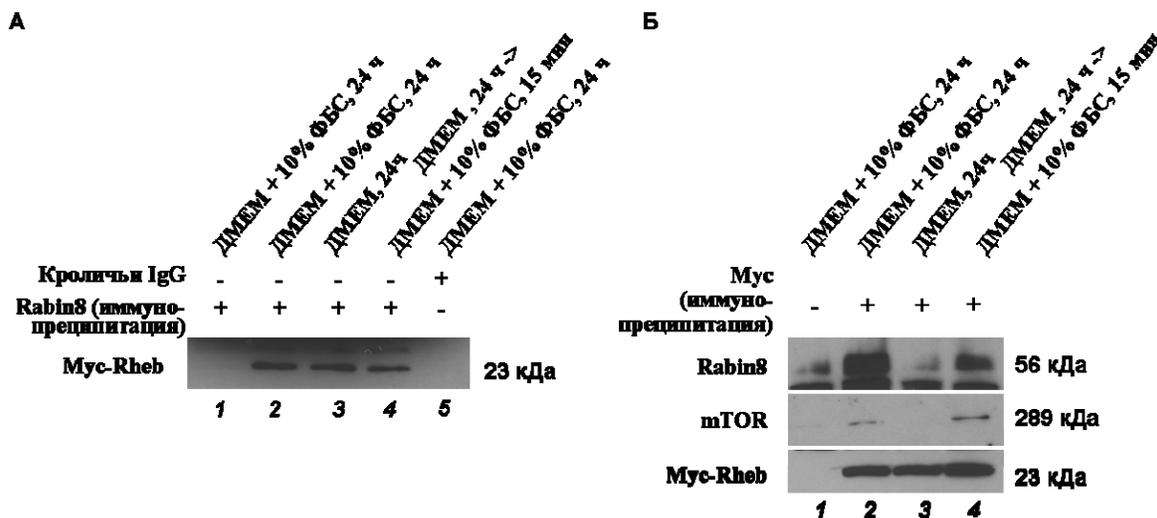


Рис. 10. Коиммунопреципитация белков рабин-8 и Rheb, экспрессированных в клетках HEK293 после их трансфекции соответствующими векторами. Уровни рабина-8, туберина, и mTOR оценивали методом иммуноблотинга со специфическими антителами. **А** – Коиммунопреципитация лизатов как на Рис 9 с использованием антител к белку рабин-8 (дорожки 1–4) или с контрольными кроличьими IgG-антителами (дорожка 5) и последующим иммуноблотингом с антителами против Мус. Для иммунопреципитации с контрольными кроличьими IgG использовали лизат как на Рис 9 (дорожка 2). **Б** – Коиммунопреципитация лизатов как на Рис 9 с использованием антител против эпитопа Мус и последующего иммуноблотинга с антителами против рабина-8, mTOR и Мус.

Для изучения взаимодействия рабина-8 и Rheb мы провели коиммунопреципитацию клеточных лизатов с антителами против рабина-8 и последующий иммуноблотинг с антителами против эпитопа Мус слитого белка Мус-Rheb (рис. Рис 10А). Оказалось, что взаимодействие Rheb с рабином-8 не зависит от присутствия ростовых факторов в среде (Рис 10А, дорожки 2–4). При этом мы не обнаружили Rheb при иммунопреципитации с антителами против рабина-8 в контрольном лизате без экспрессии Мус-Rheb (Рис 10А, дорожка 1) или в лизате, в котором для коиммунопреципитации использовали неспецифические контрольные кроличьи IgG (Рис 10А, дорожка 5), что подтверждает специфичность данного взаимодействия. Чтобы подтвердить

взаимодействие белков рабин-8 и Rheb, мы провели реципрокную коиммунопреципитацию. Клеточные лизаты инкубировали с антителами против эпитопа Мус слитого белка Мус-Rheb, а для последующего иммуноблотинга использовали антитела против mTOR и рабина-8. Как и ожидалось, Rheb и mTOR взаимодействовали в присутствии ростовых факторов в среде (**Рис 10Б**, дорожки 2 и 4). Rheb и рабин-8 также взаимодействовали между собой в среде, содержащей ростовые факторы (**Рис 10Б**, дорожки 2 и 4), однако в отсутствии ростовых факторов мы не обнаружили как взаимодействия Rheb с рабином-8, так и Rheb с mTOR (**Рис 10Б**, дорожка 3). Отсутствие взаимодействия между белками Rheb и рабин-8 в среде без ростовых факторов может быть следствием ингибирования активности белка Rheb и изменения его конформации (в отсутствии ростовых факторов происходит активация гамартин/туберинового комплекса, который ингибирует активность ГТФазы Rheb) или изменения внутриклеточной локализации одного из этих белков, тем не менее при реципрокной коиммунопреципитации с антителами против белка рабин-8 (**Рис 10А**, дорожка 3) данное взаимодействие не нарушалось.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ДАЛЬНЕЙШИЕ ПЕРСПЕКТИВЫ

В последние несколько лет резко возрос интерес к аутофагии не только как к гомеостатическому процессу, обеспечивающему деградацию внутриклеточных белков и способствующему клеточному обновлению, но и как к процессу, играющему важнейшую роль при развитии различных патологий. Одной из таких патологий является развитие опухолей в результате инактивации генов супрессоров опухолевого роста или активации онкогенов.

При сравнении уровня аутофагии в различных клеточных линиях с интактным и инактивированным геном *TSC2* нами установлено, что инактивация гена *TSC2* приводит к снижению уровня аутофагии как в нормальных условиях, так и в условиях клеточного стресса. Аутофагия также снижена в опухолевых клетках с инактивированным геном *TSC2* от больных ТС по сравнению с окружающими нормальными клетками. Использование рапамицина – ингибитора киназного комплекса mTORC1 – показало, что снижение уровня аутофагии в клетках с инактивированным

геном *TSC2* происходит в результате активации mTORC1, и ингибирование последнего приводит к нормализации уровня аутофагии. Также в результате нашего исследования была выявлена ранее неизвестная функция белка рабин-8, который регулирует активность киназного комплекса mTORC1 в результате взаимодействия с ГТФ-азой Rheb.

Чтобы выяснить последствия снижения уровня аутофагии в клетках, мутантных по гену *TSC2*, аутофагию ингибировали двумя способами - с помощью короткошпилечных РНК против генов *Atg5* и *Beclin1* или с помощью хлорохина - фармакологического ингибитора аутофагии. Показано, что ингибирование аутофагии снижало окислительную функцию митохондрий и синтез АТФ, индуцировало клеточную смерть в условиях ограниченного количества питательных веществ в среде, а также приводило к замедлению опухолевого роста.

ВЫВОДЫ

1. Впервые прямо продемонстрировано, что инактивация гена *Tsc2*, кодирующего туберин, в культуре клеток мышинных эмбриональных фибробластов приводит к снижению количества аутофагосом и активности аутофагии. Также наблюдали сниженный уровень аутофагии в клетках с инактивированным геном *Tsc2* в условиях биоэнергетического стресса *in vivo* (на модели подкожных опухолей в иммунодефицитных мышах). Значительное снижение уровня аутофагии показано также при сравнении образцов из почечных опухолей при ТС и из нормальной прилегающей почечной ткани.

2. Показана зависимость регуляции аутофагии туберин/гамартиновым комплексом от активности киназного комплекса mTORC1 с использованием рапамицина в качестве ингибитора киназного комплекса mTORC1.

3. Установлено, что дальнейшее ингибирование аутофагии в результате инактивации гена *Atg5* с помощью РНК-интерференции в клетках с инактивированным геном *Tsc2* приводит к снижению уровня АТФ, активации клеточной смерти в условиях ограниченного количества питательных веществ, а также к массовой клеточной гибели и образованию некротических зон при

росте подкожных опухолей в иммунодефицитных мышцах. Ингибирование аутофагии в результате инактивации одного аллеля гена *Beclin1 (Atg6)* или использования хлорохина замедляет развитие почечных цистаденом в трансгенных мышцах, гетерозиготных по гену *Tsc2*.

4. Показано, что одновременное ингибирование киназного комплекса mTORC1 (с использованием рапамицина) и аутофагии (с использованием хлорохина) у иммунодефицитных мышцей и мышцей, гетерозиготных по гену *Tsc2*, приводит к более выраженному уменьшению подкожных опухолей и замедлению развития почечных цистаденом по сравнению с мышцами, получавшими только рапамицин или хлорохин.

5. Выявлена новая функция белка рабин-8, состоящая в ингибировании активности киназного комплекса mTORC1, в опытах на культуре клеток НЕК293 с использованием сверхэкспрессии. По данным коиммунопреципитации, белок рабин-8 взаимодействует с ГТФ-азой Rheb и киназным комплексом mTORC1.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах:

1. Jane Yu, Andrey Parkhitko and Elizabeth Petri Henske. Autophagy: an 'Achilles' heel of tumorigenesis in TSC and LAM. *Autophagy*. 2011 Nov 1;7(11):1400-1.

2. Пархитько А.А., Фаворова О.О., Henske E.P. Белок рабин-8 взаимодействует с GTP-азой Rheb и ингибирует фосфорилирование Ser235/Ser236 в белке S6 малой рибосомной субъединицы. *Acta Naturae*, 2011, т. 3, № 3 (10), стр. 41-47.

3. Parkhitko A, Myachina F, Morrison TA, Hindi KM, Auricchio N, Karbowiczek M, Wu JJ, Finkel T, Kwiatkowski DJ, Yu JJ, Henske EP. Tumorigenesis in tuberous sclerosis complex is autophagy and p62/sequestosome 1 (SQSTM1)-dependent. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Jul 26;108(30):12455-12460.

4. Yu J, Parkhitko AA, Henske EP. Mammalian target of rapamycin signaling and autophagy: roles in lymphangioliomyomatosis therapy. *Proc Am Thorac Soc*. 2010 Feb;7(1):48-53.

Материалы конференций:

1. Andrey Parkhitko, Jane Yu, Faina Myachina, Tasha Morrison, Elizabeth P. Henske... Role of Autophagy in the Pathogenesis and Treatment of TSC and LAM. 2011 Keystone Symposia Meeting Abstract Book "Autophagy" p. 103 Whistler , British Columbia , Canada 2011.

2. Parkhitko AA, Yu J, Myachina F, Morrison TA, Henske EP. Role of Autophagy in the Pathogenesis of Tuberous Sclerosis Complex. 2010 Keystone Symposia Meeting Abstract Book "Cell Death Pathways: Apoptosis, Autophagy and Necrosis" p. 308 Vancouver, Canada 2010.

4. Parkhitko AA, Yu J, Myachina F, Morrison TA, Henske EP. Role of Autophagy in the Pathogenesis of Tuberous Sclerosis Complex and LAM. The LAM Foundation 2010 International Research Conference Abstract Book, p. 92. Cincinnati, USA 2010.

5. Пархитко А.А., Henske Е.Р. Роль аутофагии в патогенезе туберозного склероза. Тезисы международной конференции "Рецепция и внутриклеточная сигнализация" т. 1 с. 95, г. Пущино 2009.

6. Andrey Parkhitko, Victoria A. Robb, Tasha A. Morrison, Lucinda J Hughes, Michal Jarnik, Elizabeth P. Henske. Role of autophagy in the pathogenesis of tuberous sclerosis complex. The LAM Foundation 2008 International Research Conference Abstract Book, p. 98. Cincinnati, USA 2008.

7. Victoria A. Robb, Andrey Parkhitko, Elizabeth P. Henske. Role of autophagy in the pathogenesis of tuberous sclerosis complex. 2007 Keystone Symposia Meeting Abstract Book "Autophagy In Health and Disease" p. 91 Monterey, USA 2007.

Благодарности

Автор выражает искреннюю признательность и благодарность д.б.н. профессору О.О.Фаворовой за организацию сотрудничества между кафедрой молекулярной биологии и биотехнологии РНИМУ им. Н.И. Пирогова и Фокс-Чейзовским онкологическим центром, за помощь в подготовке работы, написании статей, обзоров и ценные советы; и без кого данная работа не могла бы быть завершена.