

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
"Московский физико-технический институт
(национальный исследовательский университет)"

На правах рукописи

Ануфриева

Ксения Сергеевна

«Исследование общих закономерностей изменения сплайсинга пре-мРНК под
воздействием химиотерапевтических препаратов»

03.01.09 – математическая биология, биоинформатика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва - 2021

Работа прошла апробацию в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования "Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)"

Научный руководитель: Арапиди Георгий Павлович, кандидат биологических наук, научный сотрудник, лаборатории системной биологии ФГБУ ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России.

Ведущая организация: Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого».

Защита состоится «24» декабря 2021 года в 10.00 на заседании диссертационного совета ФБМФ 03.01.09.007, по адресу: 141701, г. Долгопрудный Московской обл., Институтский переулок, д. 9.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Московского физико-технического института (национальный исследовательский университет) <https://mipt.ru/education/post-graduate/soiskateli-biologicheskie-nauki.php>.

Работа представлена «08» октября 2021 г. в Аттестационную комиссию федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)» для рассмотрения советом по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук в соответствии с п .3.1 ст. 4 Федерального закона «О науке и государственной научно - технической политике»

Ученый секретарь диссертационного совета: Зубарев Илья Владимирович, кандидат биологических наук.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Сплайсинг пре-мРНК является механизмом обеспечения протеомного и транскриптомного разнообразия в эукариотических клетках. В последние годы появляется все больше публикаций, показывающих, что дефекты сплайсинга пре-мРНК могут способствовать росту и химиорезистентности опухолевых клеток. Поэтому аномальные изменения сплайсинга пре-мРНК считаются одной из ключевых особенностей злокачественных опухолей, и систематические исследования альтернативного сплайсинга могут предоставить потенциальные биомаркеры для диагностики злокачественных опухолей. В рамках проекта The Cancer Genome Atlas ранее был проведен крупномасштабный анализ альтернативного сплайсинга пре-мРНК, по результатам которого было обнаружено около 24 млн. сплайсинговых событий, 30% из которых были обнаружены только в когорте опухолевых образцов и не были зафиксированы среди образцов нормальной ткани¹. Несмотря на всесторонний анализ альтернативного сплайсинга пре-мРНК в злокачественных клетках относительно нормальных, ранее не проводили глобального скрининга изменений альтернативного сплайсинга после химиотерапевтического воздействия. На наш взгляд, необходимо понимать механизмы эволюции выживших после химиотерапии опухолевых клеток, чтобы иметь возможность остановить или, по крайней мере, замедлить их рост. Знания о механизмах изменения альтернативного сплайсинга после воздействия стресса могут помочь в разработке новых подходов комбинированной химиотерапии в сочетании с традиционными препаратами.

Научная новизна и практическая значимость

Так как химиотерапия является одним из основных способов лечения злокачественных новообразований, важно увеличивать пул эффективных препаратов и разных схем лечения для предотвращения развития устойчивости и, следовательно, рецидивов заболевания. В опубликованных работах нами было показано, что под воздействием химиотерапии опухолевые клетки секрецируют сигнальные компоненты, которые способны поддерживать пролиферацию и повышать химиорезистентность выживших клеток². Мы обнаружили, что секретомы злокачественных клеток после воздействия химиотерапии обогащены белками сплайсосомы.

¹ David J.K. et al. Putatively cancer-specific exon-exon junctions are shared across patients and present in developmental and other non-cancer cells // NAR Cancer. Oxford Academic, 2020. Vol. 2, № 1.

² Shender V.O. et al. Proteome-Metabolome Profiling of Ovarian Cancer Ascites Reveals Novel Components Involved in Intercellular Communication // Mol. Cell. Proteomics. ASBMB, 2014. Vol. 13, № 12. P. 3558–3571.

Исследование роли сплайсосомы в развитии опухолей и применение этих знаний для разработки новых терапевтических подходов представляет большой интерес, однако изменение экспрессии сплайсосомных генов и представленности соответствующих белков в ответ на химиотерапевтические препараты плохо изучено. Мы впервые показали, что под действием сильного стресса клетка стремится резко уменьшить представленность белков сплайсосомы, используя несколько подходов: секреции их во внеклеточное пространство, снижая экспрессию соответствующих генов и нарушая сплайсинг их пре-мРНК. Согласно нашим результатам, снижение представленности сплайсосомных белков может способствовать выживанию опухолевых клеток после терапии: запускает арест клеточного цикла и сигнализирует клетке о необходимости reparации ДНК. Мы показали, что подобный ответ опухолевых клеток на химиотерапию, вызывающую повреждение ДНК, может быть подавлен ингибиторами сплайсинга (например, пладиенолидом Б). В нашей работе впервые было продемонстрировано, что последовательная обработка опухолевых клеток низкими дозами ингибитора сплайсинга и ДНК-повреждающим агентом, цисплатином, приводит к синергетическому эффекту *in vitro*.

Описанные результаты, помимо научной новизны, имеют прикладную значимость для медицины. Возможно, предложенное сочетание химиопрепаратов ляжет в основу новых способов комбинированной химиотерапии и поможет снизить системную токсичность вследствие использования более низких терапевтических доз обоих препаратов. Недавно было показано, что сплайсосомные белки играют важную роль в устраниении повреждений ДНК. Однако, насколько нам известно, не существует работ, в которых пытались бы ингибировать неспецифические воздействия сплайсосомных белков и нарушать эффективность ДНК reparации, тем самым, улучшая существующие подходы лечения злокачественных опухолей.

Цели и задачи работы

Целью данной работы являлось исследование общих паттернов изменений альтернативного сплайсинга пре-мРНК в опухолевых клетках после воздействия различных стрессовых факторов.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. На основании общедоступных наборов данных РНК секвенирования определить общие паттерны изменений сплайсинга пре-мРНК в опухолевых клетках после воздействия химиотерапевтических препаратов. Сравнить полученные паттерны изменения альтернативного сплайсинга в чувствительных и резистентных к химиотерапии опухолевых клетках.
2. Найти регуляторные механизмы, ответственные за наблюдаемые изменения сплайсинга пре-мРНК после воздействия противоопухолевой терапии.

3. Проанализировать изменения профилей секреции белков и экспрессии генов в различных опухолевых клеточных линиях после воздействия терапии.

4. Предложить новые схемы комбинированной химиотерапии для преодоления химиорезистентности, возникающей в результате aberrантного спlicingа в опухолевых клетках под воздействием традиционных химиопрепараторов.

Структура диссертации

Диссертационная работа изложена на 139 страницах и состоит из введения, обзора литературы по предметной области, основной части, заключения, выводов, списка литературы, включающего 240 ссылок. Диссертация содержит 19 рисунков и 2 таблицы.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных результатов обеспечена использованием современных методов обработки данных секвенирования, использованием больших массивов данных, а также согласованностью с результатами, полученными другими исследователями. По теме научной работы автором было опубликовано 6 научных статей в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК РФ. Результаты исследования были представлены на 6 научных конференциях: The 2nd International Caparica Conference in Splicing (Лиссабон, 2018 г.); Moscow Conference on Computational Molecular Biology (Москва, 2019 г.); II Объединенном Научном Форуме, VI съезде физиологов СНГ, VI съезде биохимиков России, IX Российский Симпозиуме «Белки и Пептиды» (Дагомыс, 2019 г.); Experimental Biology (онлайн конференция, 2021 г.); V Международной конференции Постгеном (Казань, 2018); 43rd FEBS Congress (Прага, 2018 г.).

Основные положения, выносимые на защиту

1. Было выявлено, что различные типы химиопрепараторов приводят к одинаковым изменениям в спlicingе пре-мРНК в опухолевых клетках. Наиболее частыми событиями альтернативного спlicingа являются удержание инtronов и включение экзонов в пре-мРНК сплайсосомных генов. Как в опухолевых, так и в нормальных клетках в ответ на химиотерапию происходят схожие изменения спlicingа пре-мРНК. Однако в резистентных к химиотерапии опухолевых клетках в отличие от чувствительных не происходит дисрегуляции спlicingа спlicingовых генов.

2. Было показано, что около 23% от общих событий альтернативного спlicingа, возникающих после воздействия химиопрепараторов, приводят к нарушению последовательностей белок-кодирующих изоформ.

3. Показано, что сплайсинговые события такие, как удержание инtronов, включение или пропуск экзонов в транскриптах, кодирующих сплайсосомные белки, задействованы в петлях авторегуляторной обратной связи. Сплайсинговые факторы связываются со своей пре-мРНК и способствуют удержанию инtronов, включению или пропуску экзонов в конечном транскрипте.

4. Было продемонстрировано, что под действием противоопухолевой терапии клетка стремится резко уменьшить представленность белков сплайсосомы, используя несколько механизмов: секретируя их во внеклеточное пространство, снижая экспрессию соответствующих генов и нарушая сплайсинг их пре-мРНК. Согласно нашим результатам, снижение представленности сплайсосомных белков может способствовать выживанию злокачественных клеток после терапии: запускает арест клеточного цикла и сигнализирует клетке о необходимости reparации ДНК.

5. Показано, что предварительная обработка опухолевых клеток ингибитором сплайсинга усиливает их чувствительность к цисплатину, препарату, повреждающему ДНК.

Личный вклад автора в исследование

Все результаты, представленные в этой диссертационной работе, были получены лично автором, либо под его руководством. Автор осуществлял планирование и проведение экспериментов, выбор методов, анализ и подготовку результатов к публикации.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Общие паттерны сплайсинга в опухолевых клетках под воздействием различных химиопрепаратов

Чтобы определить, как химиотерапия влияет на сплайсинг пре-мРНК в опухолевых клетках, на первом этапе работы мы проанализировали общедоступный набор данных РНК секвенирования, полученных для клеточных линий меланомы (A375), рака легких (A549, PC9, H3122), рака желудка (N87), карциномы мочевого пузыря (RT112) после воздействия различных ингибиторов киназ (эрлотиниб, кризотиниб, траметиниб, лапатиниб, вемурафениб, BGJ398). Функциональный анализ генов, затронутых альтернативным сплайсингом, выявил значительное обогащение путем сплайсинга пре-мРНК (Рисунок 1).

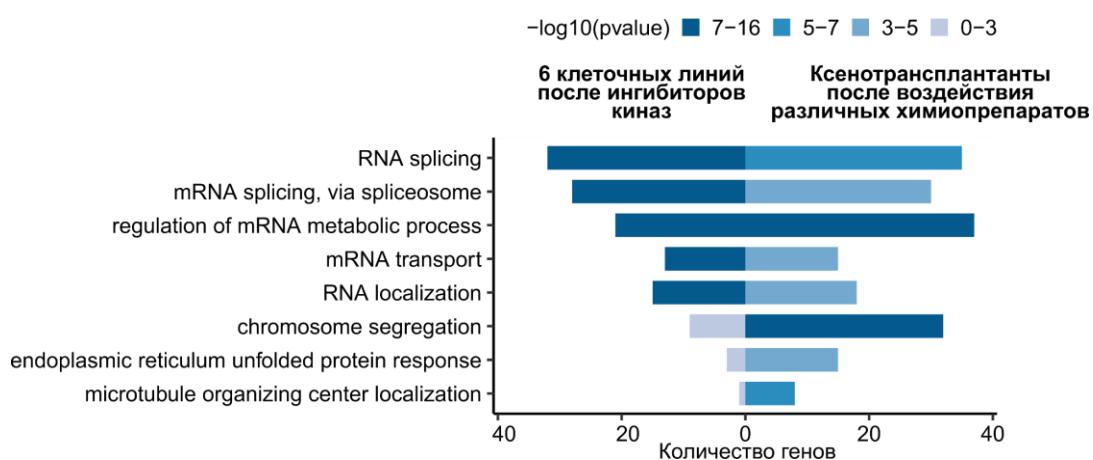


Рисунок 1 – Функциональный анализ генов, в которых после воздействия химиопрепаратов произошли общие дифференциальные сплайсинговые события более чем в половине групп сравнений в двух наборах данных секвенирования: GSE89127 (6 клеточных культур после воздействия различных ингибиторов киназ) и GSE69405 (две ткани аденокарциномы легких после 9 различных химиопрепаратов).

Чтобы подтвердить полученные результаты на более релевантной модели, мы проанализировали общедоступный набор данных секвенирования РНК, полученный для ксенотрансплантов аденокарциномы легких до и после лечения девятью различными химиотерапевтическими препаратами. На основании этих данных мы смогли проследить, какие общие изменения сплайсинга пре-мРНК возникают в одних и тех же опухолевых клетках после воздействия химиопрепаратов, имеющих различный механизм действия. Поразительно, но мы обнаружили, что разные препараты вызывают аналогичные изменения сплайсинга пре-мРНК: преимущественно изменяется сплайсинг сплайсосомных генов (Рисунок 1). Как и в предыдущем наборе данных, наиболее частыми типами сплайсинга были пропуск экзона и удержание инtronов. В общей сложности, более чем в половине сравнений мы обнаружили 951 общее событие сплайсинга, из них 290 относились к событию удержания инtronов (Рисунок 2).

	6 клеточных линий после таргетной химиотерапии	Ксенотрансплантанты после воздействия различных химиопрепаратов	
Пропуск экзона(SE)		168/27	1442/42
Альт. акцепт. сайт(A3SS)		18/2	164/4
Взаимоискл. экзоны(MXE)		7/1	90/2
Удержание интрона(RI)		77/10	290/24
Альт. донорн. сайт(A5SS)		23/2	152/4

Рисунок 2 – Количественное описание альтернативных событий сплайсинга, наблюдавшихся в наборах данных GSE89127 и GSE69405 (до косой черты: общее количество дифференциальных событий сплайсинга, наблюдавшихся хотя бы в половине групп сравнений; после косой черты: общее количество дифференциальных событий сплайсинга в сплайсосомных генах, наблюдавшихся хотя бы в половине групп сравнений).

Изменение сплайсинга пре-мРНК в различных опухолевых клеточных культурах после воздействия доксорубицина

Чтобы убедиться, что обнаруженное нами явление изменения сплайсинга транскриптов, кодирующих сплайсосомные белки, является не случайным, мы сфокусировали внимание на изучении эффекта одного химиопрепарата на различные опухолевые клеточные линии, а именно ингибитора топоизомеразы II - доксорубицина. Мы проанализировали общедоступные наборы данных секвенирования мРНК опухолевых клеточных культур пяти различных типов злокачественных новообразований: рака молочной железы (клеточная линия MDA-MB-231), рака предстательной железы (LNCaP), липосаркомы (LS8817), карциномы толстой кишки (HCT116), нейробластомы (первичная клеточная культура).

Как и в предыдущем анализе альтернативного сплайсинга наиболее частыми событиями после воздействия доксорубицина являлись пропуск экзона (~60-70% от общего числа дифференциальных событий) и удержание интрона (~10-20% от общего числа дифференциальных событий). Оказалось, что после воздействия доксорубицина в 4 из 5 опухолевых клеточных линий интроны преимущественно удерживались в последовательности пре-мРНК в ответ на действие химиопрепарата (Рисунок 3), в то время как в клетках рака молочной железы мы увидели противоположную тенденцию: последовательности инtronов более эффективно вырезались из последовательности пре-мРНК.

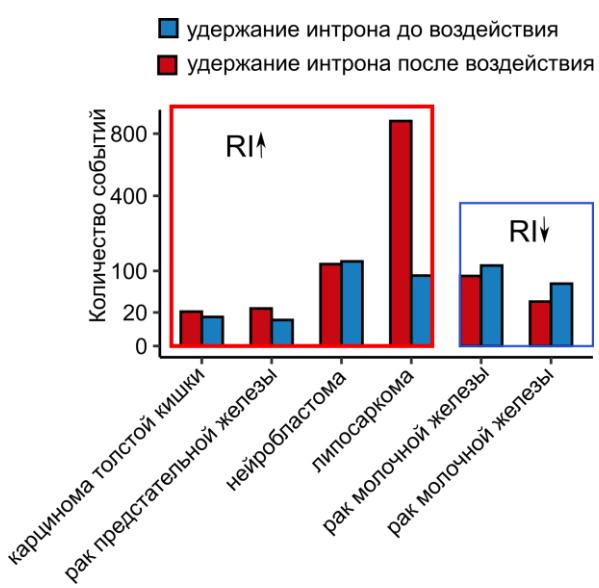


Рисунок 3 – Столбчатая диаграмма дифференциальных RI с $dpsi > 0,05$ и $dpsi < (-0,05)$ в пяти клеточных культурах после воздействия доксорубицина, где $dpsi$ – разница ψ значений опухолевых клеток после воздействия доксорубицина и опухолевых клеток без воздействия химиопрепарата; ψ – доля прочтений, подтверждающих наличие сплайсингового события.

Так же как и на предыдущем этапе, особый интерес для нас представляли альтернативные события сплайсинга, возникающие после воздействия доксорубицина независимо от типа опухоли и выбранной клеточной культуры. Мы выявили события альтернативного сплайсинга, общие хотя бы для половины исследованных клеточных культур. Было найдено 237 и 93 общих включенных экзонов и удерживаемых инtronов, соответственно, а также 119 и 23 пропущенных экзонов и вырезанных инtronов, соответственно. В результате воздействия доксорубицина вырезание инtronов из последовательности пре-мРНК становилось менее эффективным во всех опухолевых клетках. Функциональный анализ этих событий показал выявленные нами ранее тенденции (Рисунок 4): под воздействием доксорубицина нарушается сплайсинг генов, вовлеченных в регуляцию сплайсинга пре-мРНК.

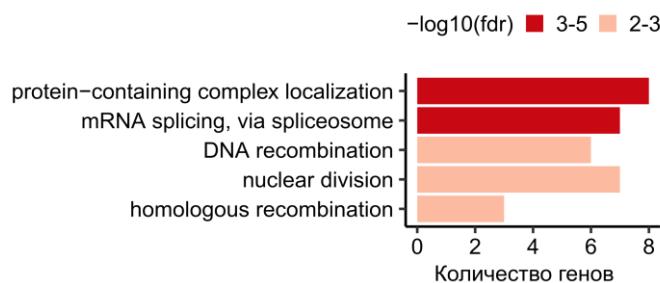


Рисунок 4 – Результаты функционального анализа терминов генной онтологии для общих удержанных инtronов после воздействия доксорубицина в 5 различных опухолевых клеточных культурах.

Сравнение паттернов сплайсинга между клетками нормальной ткани и опухолевыми клеточными линиями

Чтобы ответить на вопрос, свойственна ли тенденция изменения сплайсинга в сплайсинговых генах под воздействием химиотерапевтических препаратов в не опухолевых клеточных культурах, мы проанализировали данные РНК секвенирования нескольких типов клеточных культур после воздействия доксорубицина, включая: альвеолярные эпителиальные клетки, гладкомышечные клетки легочной артерии, клетки бронхиального эпителия, кардиомиоциты, клетки легочного эндотелия, фибробласты кожи. Функциональный анализ терминов генной онтологии показал, что в клетках нормальных тканей, так же как и в опухолевых, происходит дисрегуляция сплайсинга генов, вовлеченных в процесс сплайсинга пре-мРНК, репарации ДНК, клеточного деления и протеасомной деградации белков (Рисунок 5). При этом только в клетках нормальных тканей наблюдались изменения в сплайсинге пре-мРНК, белки которых участвуют в регуляции работы рецептора эпидермального фактора роста, в морфогенезе митохондрий, в регуляции апоптоза.

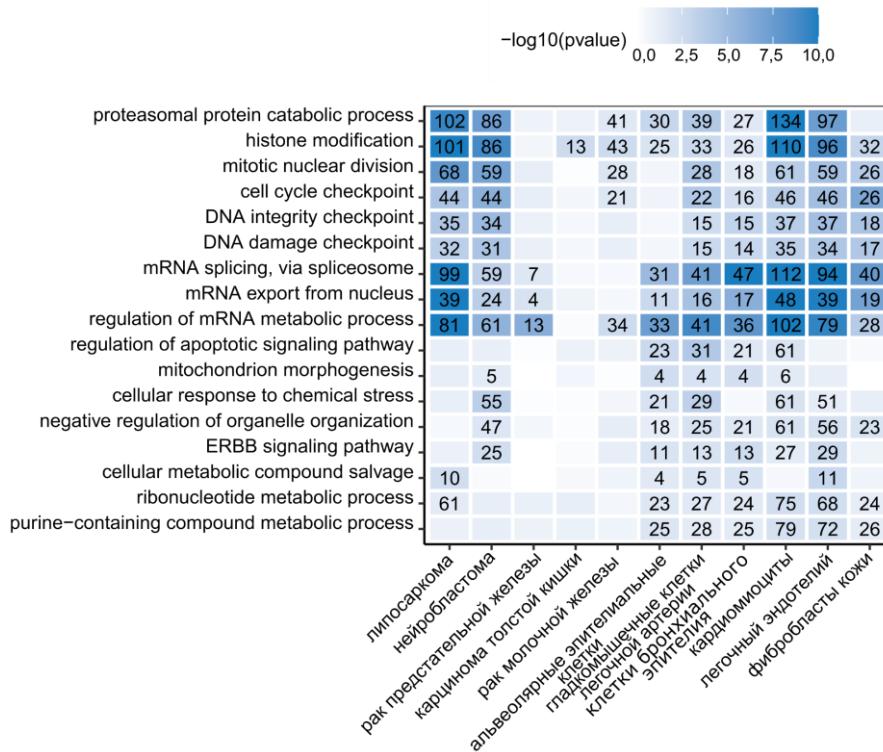


Рисунок 5 – Тепловая карта демонстрирует общие биологические процессы, гены которых подвергаются изменению сплайсинга в результате воздействия доксорубицина либо в не опухолевых, либо в опухолевых клеточных культурах.

Так же как и для опухолевых клеток, для различных клеток нормальных тканей до и после воздействия доксорубицина мы нашли события альтернативного сплайсинга, которые встречаются хотя бы в половине групп сравнения. Мы обнаружили, что воздействие доксорубицина вызывает как удержание, так и более эффективное удаление инtronов в последовательности пре-мРНК сплайсосомных белков, в то время как в опухолевых клетках

происходит только удержание инtronов после доксорубицина. Обогащение генов, из пре-мРНК которых интроны более эффективно вырезаются, также выявило значимую представленность сплайсосомных генов (Рисунок 6). Суммарно, нами было обнаружено 124 общих сплайсинговых событий, возникающих как в опухолевых, так и в клетках нормальных тканей после воздействия доксорубицина.

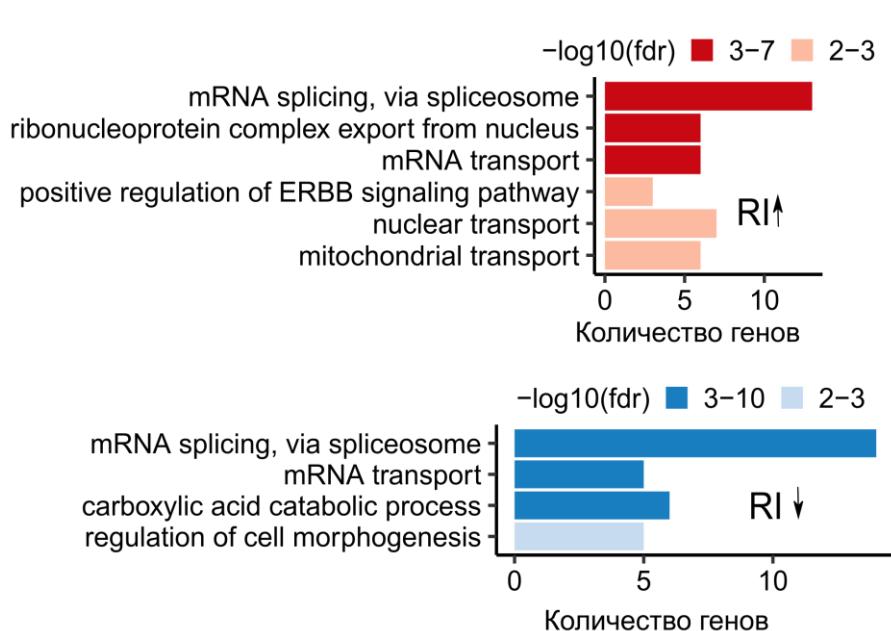


Рисунок 6 –

Результаты функционального анализа терминов генной онтологии для общих удерживаемых и вырезанных инtronов после воздействия доксорубицина в клетках нормальной ткани.

Влияние химиорезистентности на изменение паттернов сплайсинга пре-мРНК в опухолевых клетках

В результате анализа данных секвенирования мРНК, мы выявили, что изменение сплайсинга сплайсосомных генов является закономерным ответом клетки на химиотерапевтические воздействия. Согласно этой идеи, можно предположить, что у химиорезистентных клеточных линий мы не должны наблюдать изменения сплайсинга в сплайсинговых генах. Мы проанализировали изменения сплайсинга пре-мРНК в 3 парных клеточных линиях до и после воздействия химиопрепарата: резистентной и чувствительной к нератинибу клеточных линиях аденокарциномы яичников OVCAR8, резистентной и чувствительной к гефитинибу клеточных линиях аденокарциномы легких PC9, резистентной и чувствительной к цисплатину клеточных линиях аденокарциномы легких A549. Функциональный анализ терминов генной онтологии показал, что в резистентных опухолевых клетках, в отличие от чувствительных, не происходит изменение сплайсинга пре-мРНК сплайсинговых генов (Рисунок 7). Более того, дифференциально удерживаемые инtronы в сплайсинговых генах,

обнаруженные в чувствительных клеточных линиях после воздействия химиопрепарата, достоверно не изменяются в парной резистентной клеточной линии после воздействия тех же доз химиопрепарата (Рисунок 8).

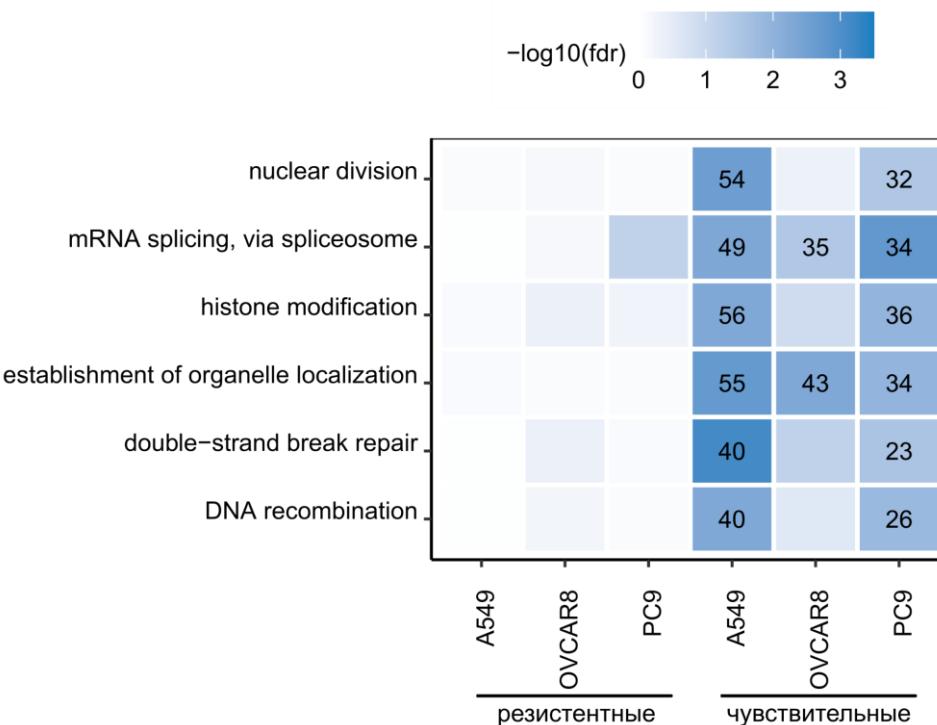


Рисунок 7 – Тепловая карта, демонстрирующая общие биологические процессы, гены которых подвергаются изменению сплайсинга в результате воздействия химиопрепарата в чувствительных, но в не резистентных клеточных линиях.

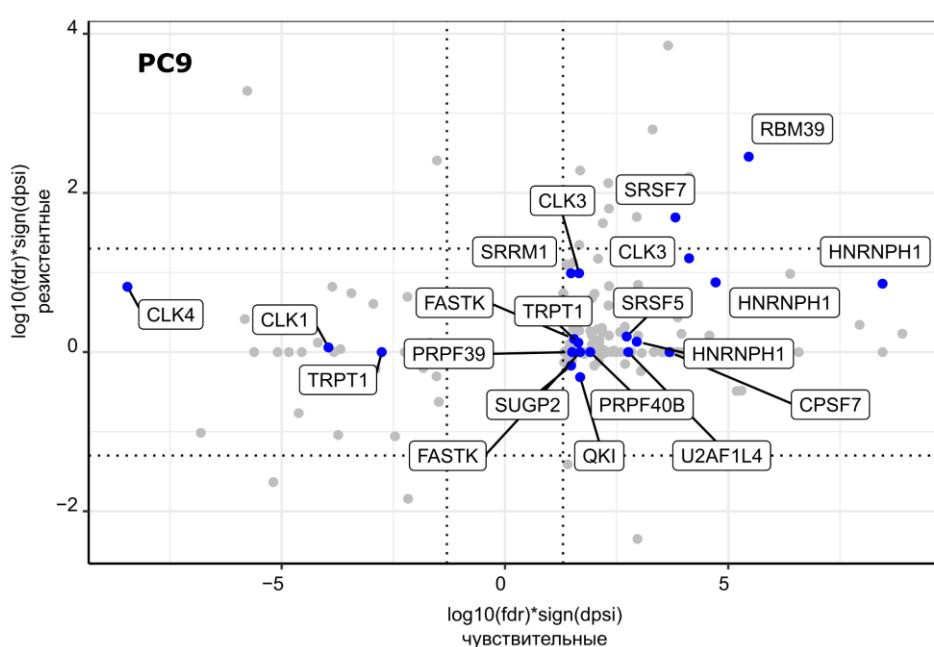


Рисунок 8 – Точечная диаграмма демонстрирует величины fdr для RI, посчитанные в двух парах сравнения: чувствительная линия PC9, до и после воздействия гефитиниба, и резистентная линия PC9, до и после воздействия гефитиниба. Равный 0,05 уровень значимости по fdr обозначен пунктирной линией. Синие точки отображают события сплайсинга пре-мРНК, белки которых входят в термин генной онтологии “RNA splicing”.

Изменения соотношений изоформ транскриптов с противоположными функциями после воздействия различных химиопрепаратов

У ряда генов, регулирующих клеточный цикл, апоптоз, ДНК репарацию, образуются изоформы белка с противоположными активностями. Поддержание соотношения представленности таких изоформ является важной физиологической программой, которая часто нарушается в опухолевых клетках. Также считается, что нарушение соотношения изоформ с противоположной активностью помогает опухолевым клеткам противостоять радио- или химиотерапии. Такие канонические изоформы с противоположным функциями встречаются, например, в следующих генах: *SYK*, *RON*, *FAS*, *RAC1*, *AIMP2*, *INSR*, *MCL1*, *CASP2*, *PKM*, *FGFR2*, *BCL2L1*. Мы обнаружили, что соотношение канонических изоформ с альтернативными функциями, в большинстве случаев, значимо не отличаются между клеточными линиями до и после воздействия химиопрепаратов (Рисунок 9). Среди всех канонических изоформ только изоформы генов *PKM* и *RAC1* меняют свою представленность после воздействия различных химиопрепаратов.

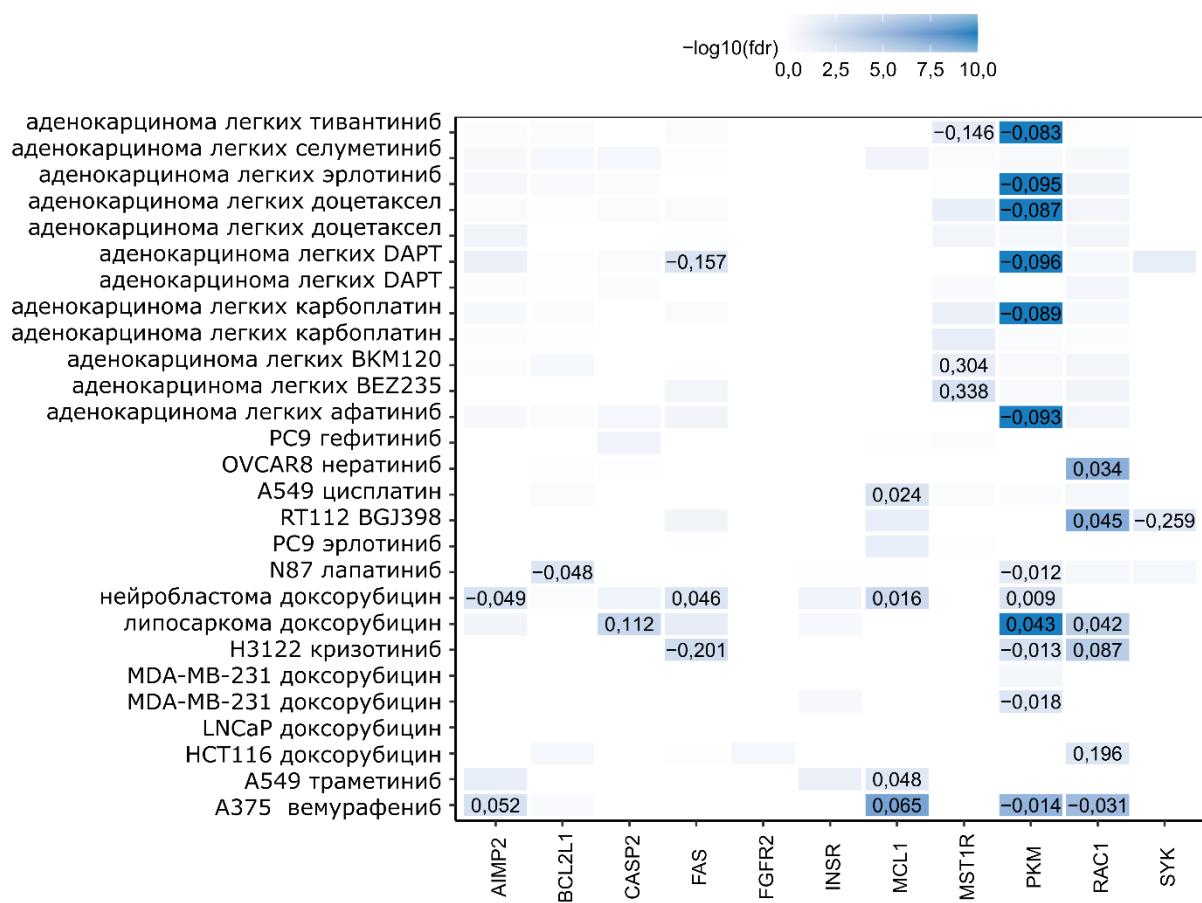


Рисунок 9 – Тепловая карта демонстрирует достоверность изменения сплайсинга премРНК среди изоформ белков с противоположными функциями в опухолевых клеточных культурах после воздействия различных химиопрепаратов.

Особенности удержанных инtronов после воздействия химиотерапии

Так как при исследовании каждой клеточной культуры мы видим идентичные паттерны изменения сплайсинга после воздействия химиопрепараторов, на следующем этапе мы объединили данные изменения сплайсинга пре-мРНК для 27 уже проанализированных чувствительных опухолевых клеточных культур и первичных культур. Были отобраны только те изменения сплайсинговых событий, которые мы встретили больше чем в $\frac{1}{4}$ пар сравнений, то есть мы оставили только те сплайсинговые события, изменения которых были одновременно сонаправлены и значимы хотя бы в 7 сравнениях. Именно это 991 событие альтернативного сплайсинга стало объектом нашего дальнейшего исследования (Рисунок 10).

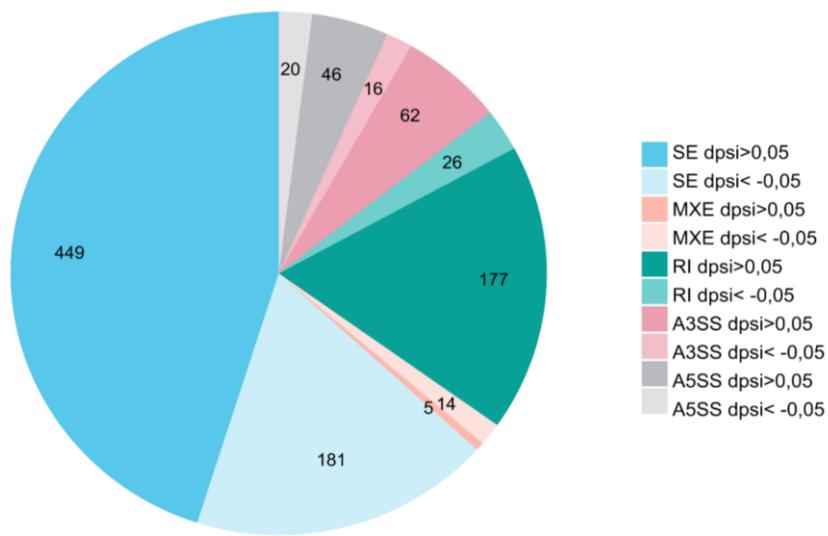


Рисунок 10 – Распределение общего 991 сплайсингового события между типами сплайсинга.

Из всех общих сплайсинговых событий наибольший интерес представляют удержанные интраны, как одни из самых высоко представленных. Оказалось, что интраны, удерживаемые после химиотерапии, имеют более низкое содержание гуанин-цитозина, являются более длинными по сравнению с интранами, не меняющими свою представленность после воздействия химиотерапии (Рисунок 11). Найденные нами интраны, ожидаемо, имели слабые 5'- и 3'-сайты сплайсинга. Более того, мы обнаружили, что экзоны, фланкирующие интраны со стороны 3'-сайта сплайсинга, значительно короче. Также мы проанализировали влияние найденных общих удержанных интранов после воздействия химиотерапии на представленность белок кодирующих изоформ в клетке. 97 удержанных интранов приводят к сокращению открытой рамки считывания, вследствие появления стоп-кодона в последовательности удержанных интранов.

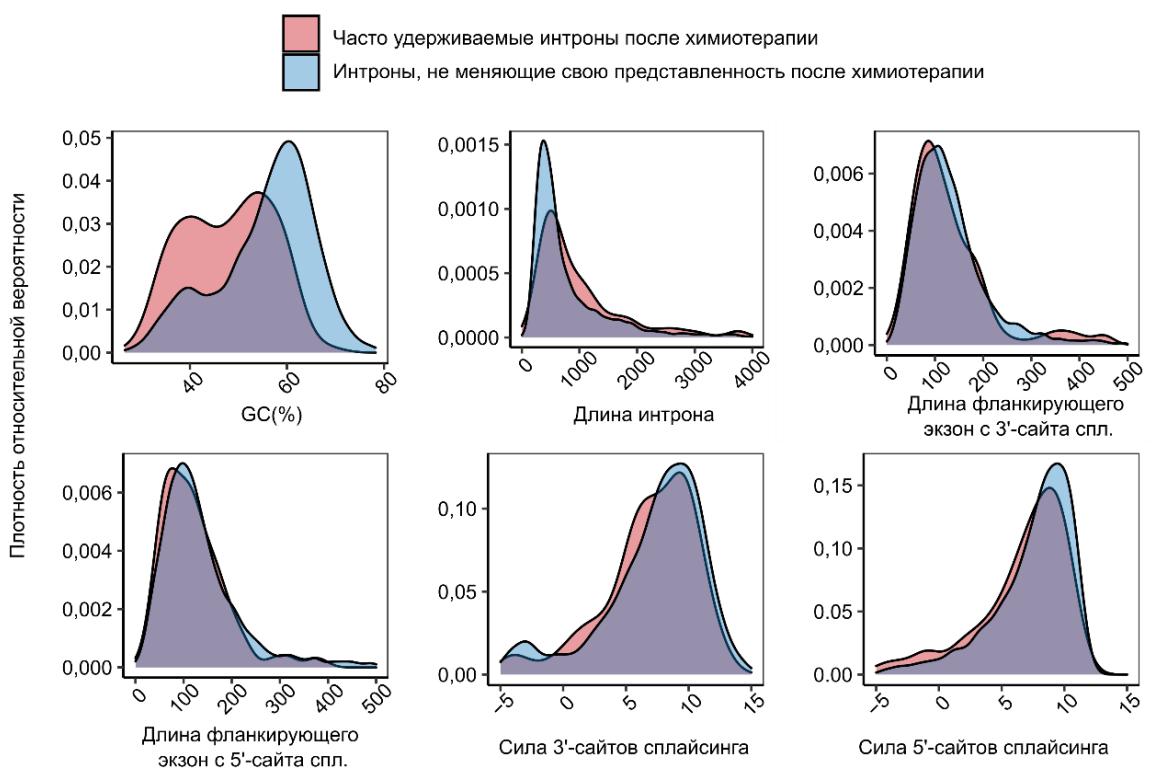


Рисунок 11 – Распределение частот величин: длины последовательностей инtronов, длины последовательностей фланкирующих экзонов, GC-состав последовательностей инtronов, силы 3'- и 5'-сайтов сплайсинга удерживаемых и не удерживаемых инtronов после воздействия химиотерапии.

Особенности включенных и пропущенных экзонов после воздействия химиотерапии

При анализе характеристик общих сплайсинговых событий, возникающих после воздействия химиопрепараторов, а именно включенных и пропущенных экзонов, мы обнаружили, что согласно аннотации генома человека более 150 таких событий, входят в транскрипты, которые подлежат нонсенс опосредованному распаду в клетке. Нонсенс-зависимый распад мРНК (NMD, англ. Nonsense-mediated mRNA decay) – это механизм, который управляет распадом мРНК. Компоненты NMD комплекса разрушает молекулы мРНК, несущие преждевременные стоп-кодоны. Ранее в литературе было описано два класса экзонов, включение и пропуск которых приводит к NMD распаду пре-мРНК, их называют “токсичные” или “существенные”, соответственно. Мы проанализировали общедоступные данные РНК секвенирования после нокдауна генов NMD комплекса, и показали, что существует достоверное пересечение между общими включенными и пропущенными экзонами после химиотерапии и “токсичными” и “существенными” экзонами, обнаруженными после нокдауна компонентов NMD комплекса (Рисунок 12). Более того, оказалось, что большинство найденных нами общих включенных после

химиотерапии экзонов относилось к сплайсосомным генам и являлось “токсичными”, то есть включение этих экзонов приводит к деградации пре-мРНК (Рисунок 13). Если суммировать включенные и пропущенные экзоны, подверженные деградации посредством NMD комплекса, удержанные интроны, нарушающие открытые рамки считывания белок кодирующих изоформ, то получается, что около 23% от общих событий альтернативного сплайсинга приводят нарушению последовательностей белок-кодирующих изоформ.

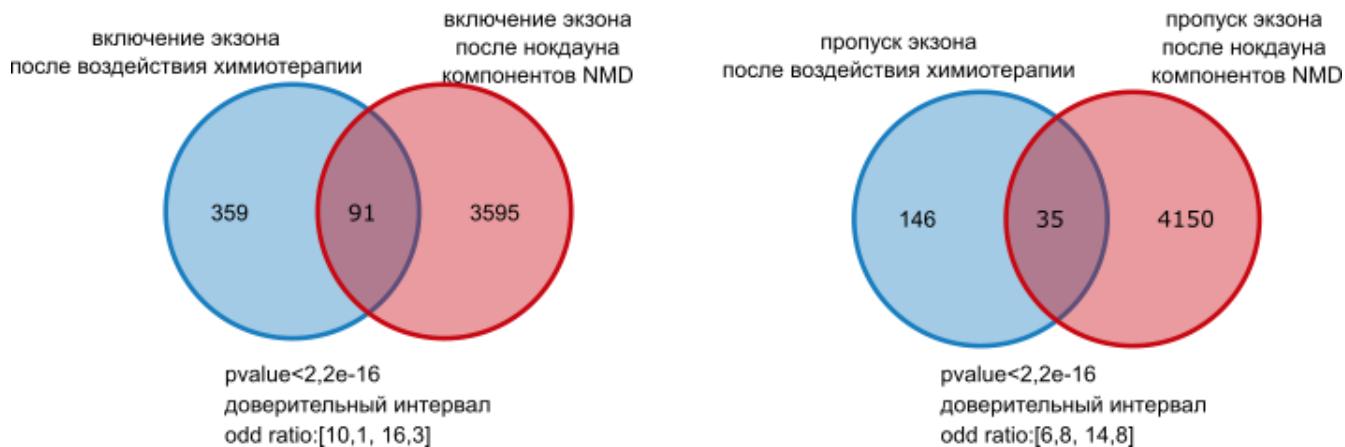


Рисунок 12 – Диаграммы венна показывают пересечение общих пропущенных и включенных экзонов, возникающих после химиотерапии, и общих пропущенных и включенных экзонов после нокауна компонентов NMD комплекса.

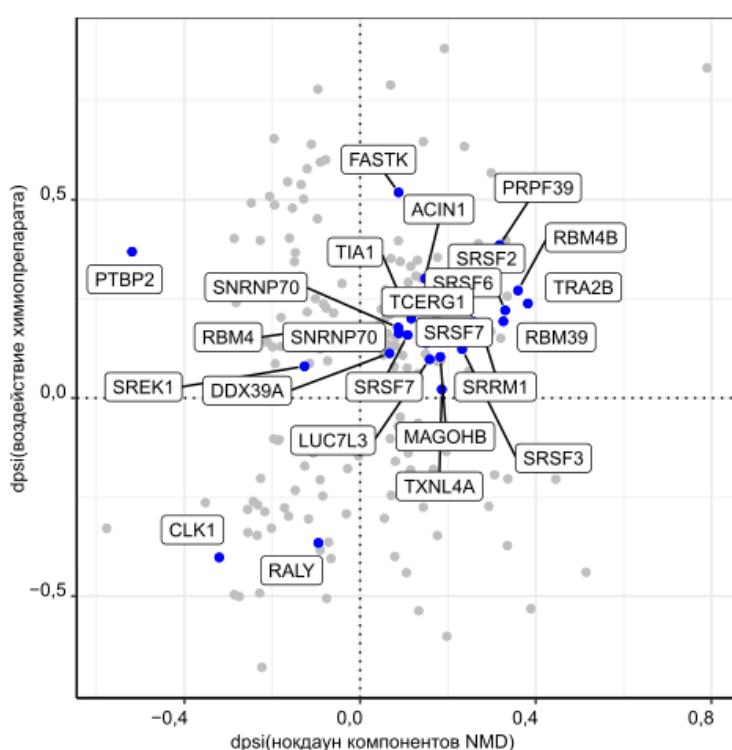


Рисунок 13 – Точечная диаграмма отображает значение dpsi для всех SE, которые являются дифференциальными после нокаута компонентов NMD комплекса (ось абсцисс) и входят в число общих событий альтернативного сплайсинга среди 27 пар сравнений опухолевых клеточных культур до и после химиотерапии (ось ординат). Синие точки отображают события сплайсинга пре-мРНК, белки которых входят в термин генной онтологии “RNA splicing”.

Прогнозирование изменений альтернативного сплайсинга

Для того чтобы найти сплайсинговые факторы, которые регулируют общие сплайсинговые события, возникающих после воздействия химиотерапевтических агентов, мы построили различные модели машинного обучения. Модели машинного обучения были построены для предсказания изменений альтернативного сплайсинга на основании данных изменения экспрессии сплайсинговых факторов по данным РНК секвенирования проекта TCGA. На вход модели машинного обучения в качестве признаков мы подавали значения экспрессии сплайсинговых факторов пациентов из проекта TCGA. На основании этих признаков мы пытались построить регрессию, которая должна как можно более точно определять значение ψ для каждого из выбранных нами сплайсинговых событий. На основании самой оптимально построенной модели XGBoost(xgbLinear) были идентифицированы сплайсинговые факторы, которые регулируют наибольшее количество общих сплайсинговых событий, возникающих после химиотерапии. Оказалось, что сплайсинговые факторы SRSF7, SRSF3, SRRM1, HNRNPDL являются регуляторами наибольшего числа общих сплайсинговых событий, возникающих после химиотерапии. Мы проверили и подтвердили результаты машинного обучения с помощью данных РНК-белковой-иммунопреципитации.

Нам удалось показать, что для 26 сплайсинговых событий, возникающих в транскриптах, кодирующих сплайсинговые факторы, для предсказания значения ψ наибольший вклад вносят сами сплайсинговые факторы. То есть на основании построенной модели мы показали, что сплайсинговые события в пре-мРНК, кодирующих сплайсинговые белки, задействованы в петлях авторегуляторной обратной связи. Сплайсинговые факторы связываются со своей пре-мРНК и способствуют альтернативному сплайсингу в конечном транскрипте (Рисунок 14).

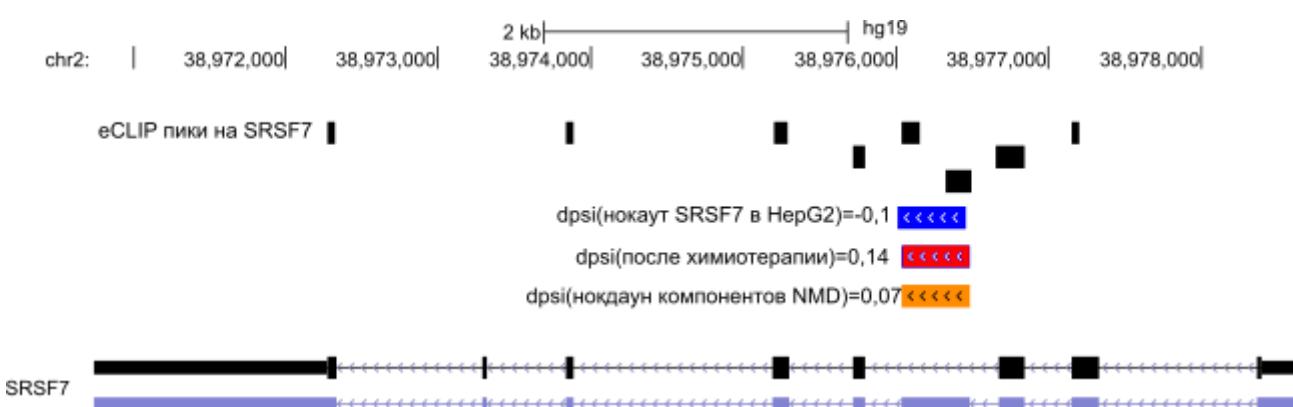


Рисунок 14 – На примере сплайсингового события SE в гене SRSF7 показана авторегуляция сплайсинговых событий в сплайсосомных генах. Отображены координаты сплайсингового события, возникающего после химиотерапии, после нокаута SRSF7 в клеточной линии HepG2 или после нокаута компонентов NMD комплекса. Так же отображены пики сшивющей РНК иммунопреципитации (eCLIP) за белок SRSF7 в клеточных линиях K562 и HepG2.

Данная гипотеза была подтверждена для сплайсинговых событий в генах *SRSF7*, *SRSF3*, *SAFB2*, *RPS3*, *RBM39*, *IGF2BP3* на основании анализа данных РНК секвенирования проекта ENCODE (ENCyclopedia of DNA elements) после нокаута соответствующих сплайсинговых факторов в клеточных линиях K562 и HepG2.

Анализ экспрессии генов после воздействия химиопрепаратов, радиации или гипоксии на опухолевые клетки

На первом этапе исследования мы выявили, что под воздействием различных химиопрепаратов происходит нарушение регуляции сплайсинга в транскриптах, кодирующих сплайсосомные белки. В результате анализа мы выяснили, что нарушения сплайсинга связаны с изменением представленности сплайсинговых факторов. Поэтому далее мы проанализировали экспрессионные наборы данных с микрочипов от 104 клеточных линий после воздействия различных типов противоопухолевой терапии: после препаратов на основе платины, после гамма-облучения, после ингибиторов топоизомераз, после ингибиторов тирозинкиназ и после taxанов (Рисунок 15). Наш мета-анализ выявил, что пути регуляции альтернативного сплайсинга и регуляции клеточного цикла значительно супрессированы после воздействия всех противоопухолевых препаратов.



Рисунок 15 – Схема мета-анализа экспрессии генов после воздействия химиопрепаратов, радиации или гипоксии на опухолевые клетки.

Изменение секреции сплайсосомных белков после воздействия противоопухолевыми препаратами или радиацией

В рамках других исследований, проведенных в нашей лаборатории, были получены данные секретомов опухолевых клеток после воздействия на них химиопрепаратов или радиотерапией. Согласно полученным данным, эти секретомы значительно обогащены компонентами сплайсосомы: как коровыми белками сплайсосомы, так и сплайсинговыми факторами. Причем эти белки принадлежали как ранним этапам процесса сплайсинга, так и поздним (Рисунок 16).

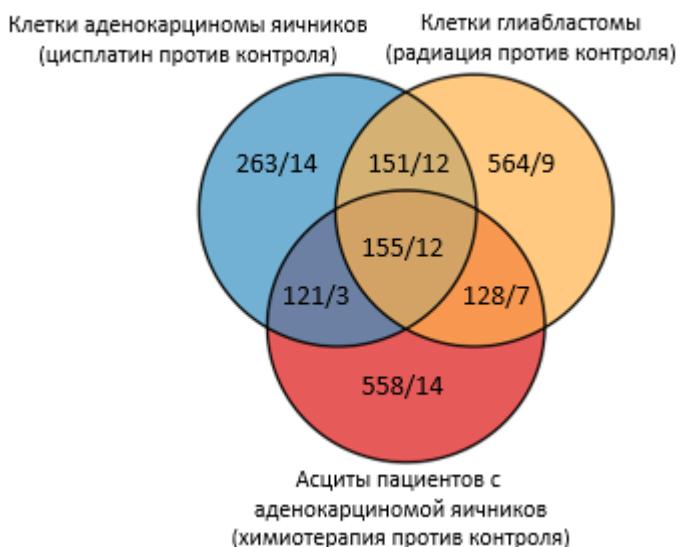


Рисунок 16 – Диаграмма венна с дифференциально повышенными белками в секретомах клеток аденокарциномы яичников после воздействия цисплатина (синий круг), в секретомах клеток глиобластомы после воздействия радиации (желтый круг) и в асцитах пациенток с аденокарциномой яичников после химиотерапии (красный круг). До знака дроби указано общее количество дифференциально секретируемых белков, после – количество сплайсосомальных белков.

Исходя из проведенных нами анализов, можно сделать вывод, что после воздействия противоопухолевой терапии в клетке происходит понижение представленности белков сплайсосомы посредством нескольких механизмов, таких как нарушение сплайсинга пре-мРНК, снижение экспрессии генов, экспорт во внеклеточную среду.

Роль сплайсосомы в остановке клеточного цикла и восстановлении после повреждений

В ранее опубликованных исследованиях уже была показана роль сплайсосомы в остановке клеточного цикла и предотвращении ДНК повреждений. Например, для получения глобального понимания молекулярных путей, которые предотвращают нестабильность генома, Paulsen с коллегами с помощью полногеномного siRNA скрининга в человеческих клетках выяснили, делеция каких генов вызывает фосфорилирование гистона H2AX³. Фосфорилирование гистона H2AX служит ранним маркером повреждения ДНК и приводит к остановке клеточного цикла. Скрининг, описанный в исследовании Paulsen, неожиданно показал, что потеря генов, вовлеченных в сплайсинг пре-мРНК, вызывала наиболее высокий уровень фосфорилирования H2AX. Мы скоррелировали результаты siRNA скрининга по фосфорилированию гистона H2AX с результатами нашего мета-анализа. По результатам точного теста Фишера белки, секретированные опухолевыми клетками после действия химио- и радиотерапии, кодируются генами, недостаточная экспрессия которых воспринимается клеткой как сигнал ДНК

³ Paulsen R.D. et al. A genome-wide siRNA screen reveals diverse cellular processes and pathways that mediate genome stability // Mol. Cell. 2009. Vol. 35, № 2. P. 228–239.

повреждения. Можно предположить, что клетка, секретируя во внеклеточное пространство некоторые белки, может, тем самым, быстрее реагировать на ДНК повреждения.

Совместное действие ингибиторов сплайсинга и препаратов, повреждающих ДНК, на выживаемость опухолевых клеток

На основании биоинформационических расчетов, мы продемонстрировали, что препараты, повреждающие ДНК, приводят к снижению представленности сплайсосомных белков в клетке. Согласно нашим результатам, изменение представленности сплайсосомных белков может способствовать лучшему выживанию опухолевых клеток после терапии, а именно снижение представленности сплайсосомных белков в клетке запускает арест клеточного цикла и сигнализирует о необходимости репарации ДНК. Поэтому мы предположили, что комбинация ингибиторов сплайсинга с ДНК-повреждающими химиопрепаратами в результате совместного действия, вероятно, снизит эффективность ДНК репарации, в результате этого усилятся воздействие ДНК-повреждающих химиопрепаратов. Различные опухолевые клеточные линии предварительно обрабатывали в течение 48 часов низкими дозами ингибитора сплайсинга пладиенолидом Б, а затем добавляли цисплатин. Анализ уровня апоптоза в 7 клеточных линиях (SKOV3, MCF7, HT29, Hela, A549, HepG2 и U87MG) методом проточной цитофлуориметрии показал, что даже наномолярные концентрации ингибитора сплайсинга пладиенолида Б значительно повышают чувствительность различных опухолевых клеток к цисплатину (Рисунок 17).

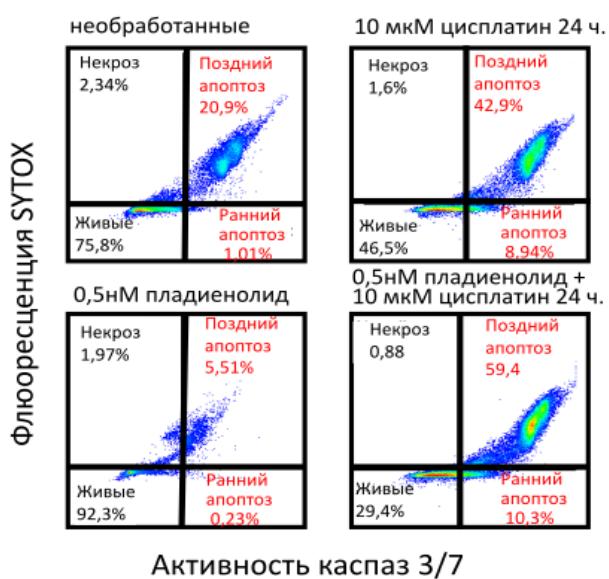


Рисунок 17 – Определение активности каспазы 3/7 в окрашенных SYTOX клетках A549 после обработки 0,5 нМ пладиенолида Б, 10 мкМ цисплатина или их комбинацией.

Наши результаты показывают, что низкие дозы ингибитора сплайсинга (пладиенолида Б) в сочетании с широко распространенным химиопрепаратором для лечения аденокарциномы

яичников, цисплатином, имеют более высокий цитотоксический эффект на опухолевые клетки по сравнению с использованием препаратов по-отдельности. Также мы провели протеомное профилирование клеток рака яичника SKOV3 после последовательного действия пладиенолида Б и цисплатина вместе и по-отдельности. Было показано, что в результате действия двух препаратов происходит понижение представленности белков, участвующих в ДНК репарации, а также белков, участвующих в активации TP53 (Рисунок 18). Эти данные были подтверждены методом проточной цитометрии и иммунофлуоресцентным анализом (Рисунок 19).

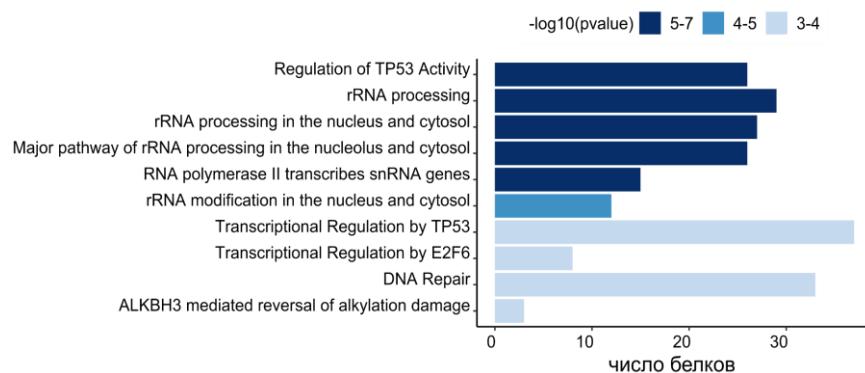


Рисунок 18

Функциональная аннотация белков, представленность которых понизилась под воздействием пладиенолида Б и цисплатина относительно необработанных клеток.

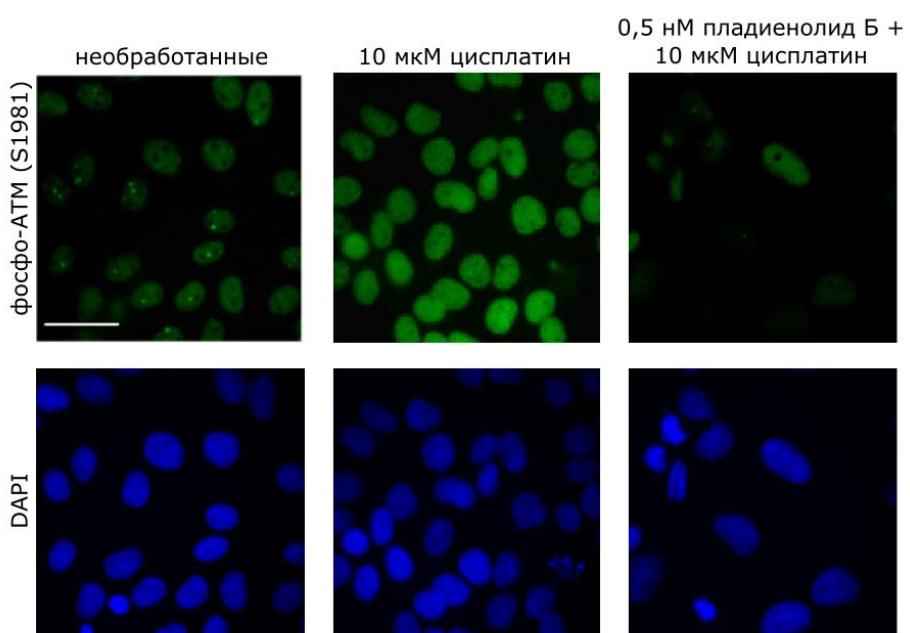


Рисунок 19 – Репрезентативные иммунофлюоресцентные изображения клеток SKOV3, окрашенных на фосфо-АТМ (S1981) (зеленый) и DAPI (синий) после обработки 10 мкМ цисплатина в присутствии или отсутствии 0,5 нМ пладиенолида Б. Масштаб: 50 мкм.

ВЫВОДЫ

1. Было показано, что различные типы химиопрепараторов приводят к одинаковым изменениям в альтернативном сплайсинге пре-мРНК в опухолевых клетках: наиболее частыми событиями являются удержания инtronов, а также пропуски и включения экзонов. В резистентных к химиотерапии клетках в отличие от чувствительных не происходит дисрегуляции сплайсинга сплайсинговых генов.

2. На основании построенной модели машинного обучения было показано, что удержания инtronов, включения и пропуски экзонов в транскриптах, кодирующих сплайсосомные белки, задействованы в петлях авторегуляторной обратной связи. Сплайсинговые факторы связываются с собственной пре-мРНК и способствуют удержанию инtronов, включению и/или пропуску экзонов в конечном транскрипте.

3. Было показано, что после воздействия химиотерапии на опухолевые клетки происходит снижение представленности белков сплайсосомы посредством удержания инtronов, пропусков и включений экзонов, снижения экспрессии генов и секреции во внеклеточное пространство белков сплайсосомы.

4. Продемонстрировано, что предварительная обработка опухолевых клеток ингибитором сплайсинга пладиенолидом Б усиливает их чувствительность к цисплатину - препарату, повреждающему ДНК.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи

1. Anufrieva Ksenia, Victoria O. Shender, Georgij P. Arapidi, Marat S. Pavlyukov, Michail I. Shakhparonov, Polina V. Shnaider, Ivan O. Butenko, Maria A. Lagarkova, and Vadim M. Govorun. 2018. “Therapy-Induced Stress Response Is Associated with Downregulation of Pre-mRNA Splicing in Cancer Cells.” *Genome Medicine* 10 (1): 49.

2. Pavlyukov Marat, Hai Yu, Soniya Bastola, Mutsuko Minata, Victoria O. Shender, Yeri Lee, Suojun Zhang, Jia Wang, Svetlana Komarova, Jun Wang, Shinobu Yamaguchi, Heba Allah Alsheikh, Junfeng Shi, Dongquan Chen, Ahmed Mohyeldin, Sung-Hak Kim, Yong Jae Shin, Ksenia Anufrieva, Evgeniy G Evtushenko, Nadezhda V Antipova, Georgij P Arapidi, Vadim Govorun, Nikolay B Pestov, Mikhail I Shakhparonov, L James Lee, Do-Hyun Nam, Ichiro Nakano. 2018. “Apoptotic Cell-Derived Extracellular Vesicles Promote Malignancy of Glioblastoma Via Intercellular Transfer of Splicing Factors.” *Cancer Cell* 34 (1): 119–35.e10.

3. Shnaider Polina, Olga M. Ivanova, Irina K. Malyants, Ksenia S. Anufrieva, Ilya A. Semenov, Marat S. Pavlyukov, Maria A. Lagarkova, Vadim M. Govorun, and Victoria O. Shender. 2020. “New

Insights into Therapy-Induced Progression of Cancer.” International Journal of Molecular Sciences 21 (21).

4. Ануфриева К. С., В. О. Шендер, Г. П. Арапиди, М. А. Лагарькова, В. М. Говорун. 2019. “Многогранная роль белков сплайсосомы в регуляции клеточных процессов.” Биоорг. химия 45 (1): 1–8.

5. Filippova J. A., A. M. Matveeva, E. S. Zhuravlev, Evgenia A. Balakhonova, Daria V. Prokhorova, Sergey J. Malanin, Raihan Shah Mahmud, Tatiana V. Grigoryeva, Ksenia S. Anufrieva, Dmitry V. Semenov, Valentin V. Vlassov and Grigory A. Stepanov. 2019. “Are Small Nucleolar RNAs ‘CRISPRable’? A Report on Box C/D Small Nucleolar RNA Editing in Human Cells.” Frontiers in Pharmacology.

6. Шендер В. О., Арапиди Г. П., Павлюков М. С., Шнейдер П. В., Ануфриева К. С., Степанов Г. А., Говорун В. М. 2018. “Роль межклеточной коммуникации в прогрессии онкологических заболеваний (обзорная статья)”. Биоорг. химия 44 (5): 471-480.

Тезисы докладов на конференциях

1. Ksenia S. Anufrieva, Victoria O. Shender, Georgij P. Arapidi, Vadim M. Govorun. “Transcription regulation of gene expression by splicing-related proteins”. In Proceedings of the 2nd International Caparica Conference in Splicing, Caparica, Portugal - 2018.

2. Ksenia S. Anufrieva, Victoria O. Shender, Georgij P. Arapidi “Combining data from TCGA and GEO databases to predict the level of alternative spliced isoforms in cancer cells”. In Proceedings of the Moscow Conference on Computational Molecular Biology (MCCMB) 2019, Moscow, Russia - 2019. <http://mccmb.belozersky.msu.ru/2019/thesis/MCCMB2019/abstracts/143.pdf>

3. К.С. Ануфриева, В.О. Шендер, Г.П. Арапиди, П.В. Шнейдер, М.А. Лагарькова, В.М. Говорун. “Влияние совместного действия ингибиторов сплайсинга и препаратов, повреждающих днк, на выживаемость раковых клеток”. II Объединенный Научный Форум, VI съезд физиологов СНГ, VI съезд биохимиков России, IX Российский Симпозиум «Белки и Пептиды», Дагомыс// ActaNaturae - 2019; спецвыпуск Т.2; с. 156. http://www.rusbiochem.org/files/uploaded/DAG2019_AbstractBook_Vol209122019.pdf

4. K. Anufrieva, V. Shender, G. Arapidi, M. Pavlyukov, P. Shnaider, M. Lagarkova, V. Govorun. “A link between alternative splicing regulationand the efficacy of cancer treatment”. FEBS OPEN BIO T.8, с. 321-321. https://2018.febscongress.org/abstract_preview.aspx?idAbstractEnc=4424170094091095097098424170.

5. Ksenia Anufrieva, Victoria Shender, Polina Shnaider, Olga Ivanova, Veronika Boichenko, Zhanat Baymukhanova, Maria Lagarkova, Georgij Arapidi. “Molecular mechanisms underlying

synergistic anticancer effects of spliceosome inhibitor combined with cisplatin". In special Issue: 2021 Meeting Abstracts, Volume 35, Issue S1, <https://faseb.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1096/fasebj.2021.35.S1.05322>.

6. Ануфриева К.С., Шендер В.О., Арапиди Г.П., Павлюков М.С., Лагарькова М.А. "Угнетение альтернативного сплайсинга мРНК как универсальный механизм реакции раковой клетки на стресс". Сборник научных трудов V Международной конференции Постгеном - 2018, Казань. <https://core.ac.uk/download/pdf/197479985.pdf>.

СОКРАЩЕНИЯ

NMD – нонсенс-зависимый распад мРНК; **SE** – пропущенный экзон; **A5SS** – альтернативное событие на 5'-конце экзона; **A3SS** – альтернативное событие на 3'-конце экзона; **RI** – удержание интрана; **MXE** – взаимоисключающие экзоны; **psi** – доля прочтений, подтверждающих наличие сплайсингового события; **dpsi** – разница psi величин между состояниями.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает искреннюю благодарность своему научному руководителю к.б.н. Арапиди Г.П. за наставничество в работе, конструктивную критику и личностный рост. Особенную благодарность автор выражает к.х.н. Шендер В.О. за неоценимую помощь в проведении исследования. Автор благодарит весь коллектив лаборатории системной биологии и молекулярной онкологии ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России за создание и поддержание дружественной атмосферы, а также за возможность обсуждения научных результатов. Автор также благодарит д.б.н. Павлюкова М.С. (лаборатория мембранных и биоэнергетических систем ИБХ РАН) за его поддержку и продуктивный совместный труд. Особую благодарность автор выражает чл.-корр. РАН, д.б.н. Лагарьковой М.А. и академику РАН д.б.н. Говоруну В.М. за помощь в написании публикаций. Выражаю сердечную благодарность к.ф.-м.н. Клименок К.Л. за его заботу и поддержку во время выполнения и написания диссертационной работы.