

На правах рукописи

ЖЕЛТУХИН АНДРЕЙ ОЛЕГОВИЧ

**РОЛЬ СЕСТРИНОВ В ПОДДЕРЖАНИИ ГОМЕОСТАЗА И РЕГУЛЯЦИИ
ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ ЖИЗНИ НЕМАТОДЫ *Caenorabditis elegans***
03.01.03 - Молекулярная биология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Москва

2018

Работа выполнена в лаборатории пролиферации клеток Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук

Научный руководитель Главный научный сотрудник лаборатории пролиферации клеток Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, доктор биологических наук, профессор **Чумаков Петр Михайлович**

Официальные оппоненты: доктор медицинских наук, профессор **Черняк Борис Викторович**
зав. лабораторией биоэнергетики клетки
Научно-исследовательского института химико-физической
биологии им. А.Н. Белозерского Московского государственного
университета им. М.В. Ломоносова,
доктор биологических наук, профессор **Лазаревич Наталия
Леонидовна**
зав. лабораторией механизмов прогрессии эпителиальных опухолей
Федерального государственного бюджетного учреждения
«Национальный медицинский исследовательский центр онкологии
им. Н.Н. Блохина» Минздрава России
(ФГБУ "НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина" Минздрава России)
Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Научно-исследовательский институт общей
патологии и патофизиологии» (ФГБНУ «НИИОПП»)

Защита диссертации состоится « ____ » _____ 2018 г. в _____ часов на заседании
Диссертационного совета Д 002.235.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении
науки Институте молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук по
адресу: 119991, Москва, ул. Вавилова, д. 32.

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 «_» _____ 2018 г.

Ученый секретарь Диссертационного совета

Кандидат химических наук

А.М. Крицын

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Старение организма, как биологический феномен, является одним из центральных объектов исследования биологической науки. Раскрытие причин и механизмов процессов возрастного угасания функций организма важно не только в плане возможного увеличения продолжительности жизни, но и для борьбы с многочисленными болезнями позднего возраста. У человека процесс старения особенно явно начинает проявляться через 25-30 лет после достижения детородного возраста, т. е. по завершении необходимого репродуктивного периода. Старение характеризуется постепенным комплексным угасанием физиологических функций организма, ослаблением устойчивости к нагрузкам и стрессам. На уровне тканей происходит замещение специфических для тканей активных клеточных компонентов соединительной ткани, появлением признаков хронического воспалительного процесса, повышенным уровнем соединений активного кислорода, которые повышают мутагенную нагрузку и истощают регенеративный потенциал тканей. На этом фоне существенно повышаются риски развития многих патологий позднего возраста, к которым относятся метаболические расстройства (ожирение, диабет), нейродегенеративные, сердечно-сосудистые и онкологические заболевания. На молекулярном и клеточном уровне происходит накопление не утилизируемых белковых агрегатов, укорочение теломер, изменение эпигенетического статуса многих генов, ослабление контроля тканеспецифической экспрессии генов, нарушения функционирования компонентов врожденного и адаптивного иммунитета. Все эти изменения являются следствием нарушений процесса гомеостаза, поддержания физиологического баланса процессов, необходимого для стабильного функционирования всех систем организма.

Существуют разные мнения по поводу биологического значения этого процесса, является ли старение специальной программой, или результатом хаотического процесса "доживания". Тем не менее, понимание природы процессов, лежащих в основе старения может позволить разработать комплекс мер, направленных на максимальное преодоление негативных проявлений, создающих почву для развития патологий, увеличить качество жизни пожилых людей, продлить период здоровой старости и увеличить как среднюю, так и максимальную продолжительность жизни.

В последние годы, благодаря революционным открытиям в области наук о жизни, наметился существенный прогресс в понимании механизмов, лежащих в основе процесса старения. Если раньше старение представлялось как следствие накопления молекулярных повреждений, вызванных длительными воздействиями неблагоприятных условий среды, то теперь ведущую роль отдается возрастному ослаблению процессов репарации клеток и тканей, центральным компонентом которых является аутофагия. Углубленное изучение процесса аутофагии открыло новые горизонты для понимания механизмов регуляции метаболических процессов, их изменения при патологиях и старении. Благодаря высокой консервативности этих механизмов их исследования проводятся на многих животных моделях, от дрожжей до млекопитающих и человека. Было установлено, что главенствующую роль в продвижении процессов старения играет нарушение баланса метаболических процессов, приводящее к все возрастающей активности сигнального пути IGF/Akt и mTOR. Этот процесс существенно тормозится при ограничении питательных веществ, приводя к активации аутофагии и существенному омоложению соматических клеток и тканей. Относительно недавно стало известно что семейство p53 и FOXO- регулируемых генов сестринов является регулятором множества процессов связанных со старением. Сестрины действуют как антиоксиданты в сигнальных сетях опухолевого супрессора p53, и как потенциальные индукторы катаболических процессов, они регулируют активность mTORкиназного комплекса 1 (TORC1) через три независимых пути - опосредуя присоединение и активацию AMPK к TSC, подавляя сигнальную ветвь TGFb-Akt, и выступая в качестве биологического сенсора уровня аминокислот, за счет связывания лейцина с специфическим участком молекулы сестрина, приводящего к конформационным перестройкам ведущим к включению системы активации киназы mTOR через ее транслокацию в места сборки активного киназного комплекса в лизосомах. Таким образом сестрины являются универсальными ингибиторами сигнального пути mTOR, а их изучение исключительно важно для понимания процессов старения и разработке средств как для замедления этого процесса,

так и для профилактики болезней позднего возраста.

Следует отметить, что ген сестрина 2 человека, являющийся по-видимому наиболее значимым представителем семейства, впервые был описан российскими исследователями, работающими в ИМБ РАН. Сестрины являются сильными индукторами аутофагии, что делает их привлекательными в качестве мишеней для создания лекарств. Семейство сестринов весьма консервативно и присутствует также у беспозвоночных, например у дрозофил и нематод. Эти модели особенно интересны для изучения функций сестринов не только благодаря своей простоте и хорошо разработанной генетике. Если у позвоночных семейство сестринов представлено тремя генами, имеющими похожие функции, то геном нематоды *Caenorabditis elegans* имеет единичный ген, что позволяет проводить эксперименты по генному нокауту и изучать соответствующие фенотипы. В связи с этим в задачи исследования входило всестороннее изучение функции сестрина нематоды *Caenorabditis elegans*, их роль в формировании фенотипа, определении продолжительности жизни, регуляции метаболизма, сопряжении с сигнальными путями, участвующими в процессах старения и развития хронических патологий.

Помимо задач связанных с изучением роли сестринов у нематод в ходе выполнения диссертационной работы были затронуты практически не связанные с данной проблемой вопросы, относящиеся к текущим задачам лаборатории. В рамках отдельной работы, связанной обязательством лаборатории по разработке проекта финансируемого Госконтрактом Министерства образования и науки (уникальный идентификатор проекта RFMEFI60714X0014), во время выполнения диссертационной работы была проведена оценка динамики онколитического действия вакцинного штамма полиовируса 1 типа на модели подкожных ксенотрансплантатах клеток глиобластомы человека, культивируемых в виде подкожных опухолей на бестимусных мышах.

Цель и задачи исследования. Целью диссертационной работы являлось:

1. Описать фенотипы нематод *Caenorabditis elegans*, имеющих делецию гена сестрина (cSESN), включающие внешние параметры, характер развития, поведения, продолжительности жизни, чувствительности к стрессам, метаболические характеристики. Воспроизвести фенотип отсутствия сестрина путем РНК интерференции, восстановить утраченный делецией гена сестрина фенотип путем трансдукции в зародышевую линию генетических конструкций для экспрессии сестрина нематоды или сестрина человека.
2. Изучить сигнальные пути, участвующие в образовании даурных личинок и их компоненты, повреждаемые при делеции гена сестрина. В частности, определить участие сестрина в сигнальном пути *daf2-daf15-daf-16* (эквивалентен сигнальному пути IGF1-Akt-FOXO у человека), сигнальном пути *daf-1-daf-4-daf-7-daf-8* и *daf-14* (эквивалентен сигнальному пути TGF- β -Smad) и гуанил-циклазном *daf-11* сигнальном пути.
3. Изучить роль сестрина в индукции аутофагии и выживаемости при ограничении калорий. Описать различия в фенотипах связанных с мобилизацией жиров при голодании в зависимости от активности гена сестрина.
4. Изучить роль сестрина в увеличении продолжительности жизни при ограничении питательных веществ и значении сигнального пути TOR в сестрин-зависимом продлении жизни.
5. Провести испытание ингибиторов TOR на модели нематод (рапамицин, торин 2), их способность индуцировать аутофагию, подавлять развитие, увеличивать продолжительность жизни. Сравнить получаемые эффекты с действием сестрина, установить возможность преодоления фенотипов связанных с отсутствием гена сестрина при действии ингибиторов TOR.
6. В рамках отдельной работы провести оценку динамики онколитического действия вакцинного штамма полиовируса 1 типа на модели подкожных ксенотрансплантатах клеток глиобластомы человека, культивируемых в виде подкожных опухолей на бестимусных мышах.

Научно-практическая значимость работы. В ходе работы были получены новые фундаментальные данные как о функции сестрина на модели нематоды *C. elegans*, так и выяснен ряд вопросов, относящихся к функционированию сигнальных путей, имеющих отношение к процессам аутофагии, регуляции метаболизма, сигналинга факторов роста, устойчивости к стрессам.

Полученные данные о роли гена сестрина нематод в аутофагии, процессе поддержания физиологического состояния клеток и тканей, лежащего в основе процессов репарации клеток и преодоления проявлений старения, позволят использовать модель нематод для поиска потенциальных лекарственных средств для модулирования активности сигнального пути TOR и процесса аутофагии. Такие соединения будут востребованы фармацевтической промышленностью для создания средств борьбы с хроническими заболеваниями позднего возраста, включая диабет, метаболический синдром, сердечно-сосудистые заболевания, идиопатическая эмфизема легких, нейродегенеративных и злокачественных заболеваний.

Фундаментальные сведения об участии сестрина в функционировании ряда сингальных путей имеют самостоятельную научную ценность как новый вклад в изучение процессов адаптации организмов к меняющимся условиям обитания и к ряду стрессов. Эти сведения будут использованы как в дальнейшей работе диссертанта, лаборатории и института, так и другими членами научного сообщества.

В ходе работ был также получен модельные линии опухолевых клеток человека с подавленной экспрессией ряда генов рецепторов проникновения в клетку энтеровирусов человека, которые могут быть использованы для диагностики энтеровирусных инфекций и определения противоопухолевой активности создаваемых новых штаммов онколитических энтеровирусов.

Таким образом, результаты проведенных исследований имеют высокую научную и практическую ценность, вносят вклад в понимание фундаментальных механизмов старения организма и закладывают основу для медикаментозного воздействия.

Методология и методы исследования. В работе были использованы разнообразные современные биологические методы, включающие культивирование нематод на твердом носителе и жидкой среде, подавление экспрессии отдельных генов с помощью РНК интерференции, процедуры скрещивания нематод и выведение гибридного потомства, эпистатический анализ сигнальных путей, поддержание и анализ мутантных штаммов нематод, определение продолжительности жизни, устойчивости к стрессам, описание фенотипов, методы анализа аутофагии с помощью микроскопии, иммуоблоттинг, получение рекомбинантных конструкций, получение трансгенных нематод путем микроинъекции в зародышевую линию, методы работ с культурами клеток, конструирование и введение лентивирусных векторов для подавления активности генов в культуре клеток, анализ экспрессии с помощью ПЦР в реальном времени, анализ экспрессии поверхностных белков с помощью проточной цитометрии, работа с иммунодефицитными мышами, поддержание колонии мышей, введение опухолевых клеток человека и анализ скорости роста опухолей, экспериментальная терапия опухолей с помощью онколитических энтеровирусов.

Степень достоверности и апробация результатов. Основные результаты работы были представлены на 5 международных конференциях. По материалам диссертации опубликовано 4 статьи.

Структура и объем диссертации. Материалы диссертации изложены на 108 страницах и включают 14 таблиц и 34 рисунка. Диссертация состоит из разделов: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Заключение», «Выводы», «Список сокращений», «Список литературы», который содержит 158 ссылок. «Приложение»

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

C. elegans - нематода *Caenorhabditiselegans*; TOR – Target of Rapamycin; ПЦР - полимеразная цепная реакция; БОЕ - бляшко-образующая единица;

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Введение

Во введении дается краткое описание проблемы старения и преимуществ модели нематод для его изучения. Даются также общие сведения о сигнальном пути TOR, возможной роли сестринов в его регуляции, гипотетической роли сестринов в адаптации организмов к стрессам и меняющимся

условиям окружающей среды. Сформулированы основные цели и задачи исследования, обоснована его актуальность, научная и практическая значимость.

1 Обзор литературы

В разделе приведены основные тенденции в изучении процесса старения, рассмотрены существующие теории и концепции связанные с этим процессом, критически разобраны современные подходы к изучению старения. Обосновано использование беспозвоночных организмов, в частности нематод, для изучения процессов старения. Приведены также данные о роли метаболизма, в частности сигнального пути TOR в механизмах старения, рассмотрены вопросы о влиянии ограничения питательных веществ в увеличении продолжительности жизни, а также роль соединений активного кислорода в ускорении процессов старения. Приведены исчерпывающие сведения о семействе генов сестринов, история их открытия, основные вехи их изучения, неоднозначности в интерпретации имеющихся в литературе сведений, основные гипотезы связанные с функцией сестринов и их роли в адаптации организмов. Внимание уделено сигнальным путям, которые по имеющимся данным задействованы в проявлении функций сестринов, а также наличие гомологичных мишеней у нематод. Намечены основные направления для дальнейшего изучения сестринов и обосновано использование модели нематод для выяснения наиболее базовых и эволюционно древних функций гена сестрина.

2 Материалы и методы

В разделе подробно описаны использованные в работе материалы - штаммы нематод, культур клеток, базовые векторы, основные методы связанные с культивированием нематод, анализом их фенотипа, получения гибридного потомства, приемы для изменения экспрессии отдельных генов с помощью РНК интерференции и микроинъекции рекомбинантных конструкций в зародышевую линию. Описаны также методы культивирования опухолевых клеток, создание рекомбинантных плазмид, методы анализа экспрессии генов с помощью ПЦР в реальном времени, иммуноблоттинга, проточной цитометрии, методы определения титров вирусов с помощью бляшек и серийными разведениями. Описаны методы работ с иммунодефицитными мышами, прививка опухолевых клеток человека, измерения динамики роста опухолей, их экспериментальной терапии с помощью онколитических вирусов.

3 Результаты и обсуждение

3.1 Влияние сестрина на размеры нематоды

Для описания фенотипа, образующегося при делеции гена сестрина, были использованы следующие штаммы нематод: штамм RB2325 имеющий генотип ok3157, несет делецию 535 пар оснований в 3 экзоне гена *cSESN*; штамм IE24589, генотип ttTi24589, содержит внедренный во второй экзон гена *cSESN* транспозон MOS-1. Для подавления экспрессии гена *cSESN* с помощью РНК-интерференции использовалась генетическая конструкция, экспрессирующая двуцепочечную РНК *cSESN*. Для реконструкции "дикого" фенотипа по гену *cSESN*, на фоне его делеции была использована генетическая конструкция для экспрессии полноразмерного гена сестрина нематоды *C. elegans*.

Первое, на что было обращено внимание - очевидное влияние сестрина на размеры нематоды (Рисунки 1 и 2). Особи штамма RB2325 с делецией гена сестрина вырастают на 8 день до на 47,59% большего размера по сравнению с дикими особями. Аналогичное увеличение линейных размеров отмечено и у особей, имеющих нарушения экспрессии сестрина за счет внедрения транспозона, или путем подавления РНК-интерференцией.

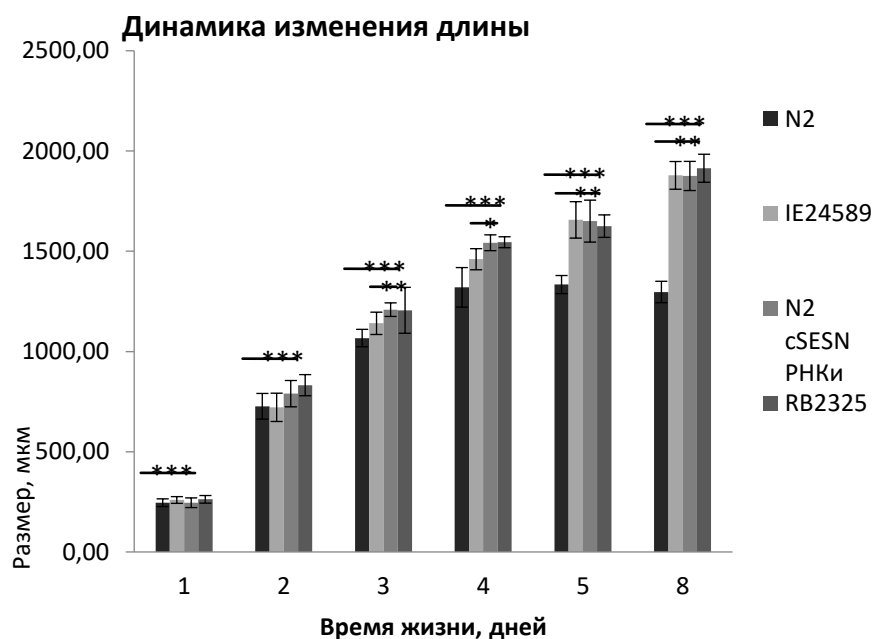


Рисунок 1. Изменение размеров нематод в зависимости от возраста. Достоверность отличия показателей в группах: * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$

Кроме того, очевидно, что нематоды дикого типа перестают расти на 5 день, тогда, как при отсутствии сестрина нематоды останавливаются в росте только на 8-й день.

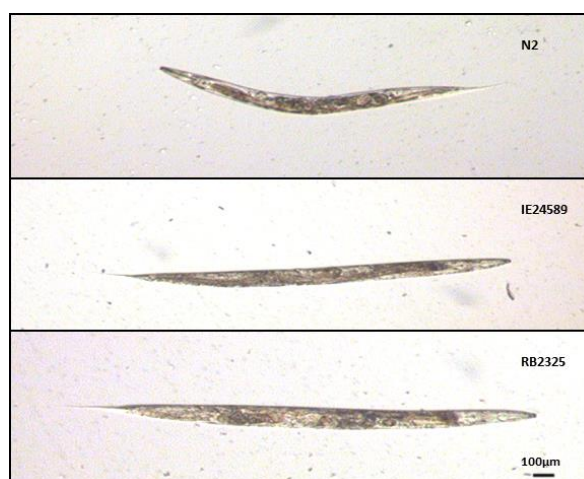


Рисунок 2. Нематоды разных штаммов, увеличение 400х. Нематоды без функционального сестрина крупнее нематод дикого типа. Шкала 100 мкм.

3.2 Роль гена сестрина в устойчивости нематоды к действию стрессов

Нами был проведен ряд тестов, в которых исследовалось влияние гена сестрина на устойчивость нематод к различным стрессам. В основе ответа на эти стрессы лежит активность сестрина как антиоксиданта или его способность активировать AMPK, подавлять mTORC1 и стимулировать аутофагию.

М9 тест. В личиночной стадии L1 нематод снимали с чашек, отмывали от бактерий и помещали в постоянно перемешиваемую (для того чтобы избежать воздействия гипоксии) среду М9 без еды, и переносили ежедневно аликвоту суспензии на чашки с едой, после чего на третий день подсчитывали развившихся во взрослые особи нематод (Рисунок 3). В отсутствие пищи, только что вылупившиеся из яиц личинки были не в состоянии продолжать свое развитие. Они задерживались в личиночной стадии L1, на которой они оставались жизнеспособными в течение примерно недели. На этой стадии

подавление аутофагии у нематод дикого типа уменьшает период, в течение которого они могут выживать в условиях голода.

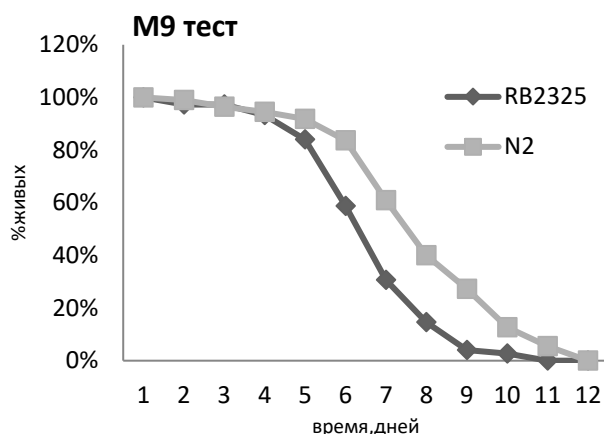


Рисунок 3. Выживание нематод в стадии L1 в среде M9 без еды. Достоверность отличия средних показателей между группами RB2325 и N2: $p < 0,0035$.

Наиболее хорошо изученной функцией сестринов у позвоночных является его антиоксидантная активность, благодаря которой сестрины способны эффективно снижать внутриклеточный уровень АФК, как образовавшийся в процессе жизнедеятельности, так и индуцированный извне. Нами был проведен АФК тест, в котором проверялась устойчивость нематод к воздействию наиболее часто используемых в исследованиях источников активных форм кислорода, таких как паракват (N,N'-диметил-4,4'-дипиридила дихлорид) и перекись водорода (Рисунки 4 и 5).

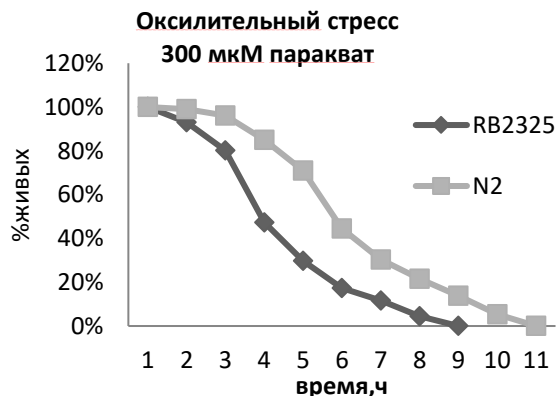


Рисунок 4. Выживание нематод в среде M9 с добавлением 300 мкМ параквата. Достоверность отличия средних показателей между группами RB2325 и N2: $p < 0,0014$.

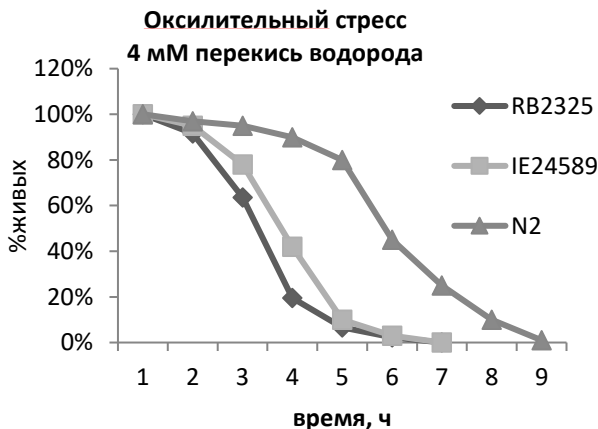


Рисунок 5. Выживание нематод в среде M9 с добавлением 4 мМ перекиси водорода. Достоверность отличия средних показателей между группами RB2325 и N2: $p < 0,0014$. Достоверность отличия средних показателей между группами RB2325, IE24589 и N2: $p < 0,0007$; между группами RB2325 и IE24589 $p < 0,04$

Аликвоту нематод помещали в среду M9, содержащую паракват в концентрации 300мкМ или перекись водорода в концентрации 4мМ и каждый час подсчитывали выжившие особи, наблюдали за движениями нематод, а позже проверяли их жизнеспособность прикосновением платиновой проволочкой (Рисунки 4 и 5).

Из полученных данных следует, что сестрин у нематод выполняет антиоксидантную функцию, значительно повышая выживаемость нематод в условиях окислительного стресса, что согласуется с исследованиями, демонстрирующими антиоксидантную активность сестринов на клетках млекопитающих.

3.3. Роль гена сестрина в образовании устойчивых к стрессам дауэровских личинок

В условиях высокой плотности популяции, недостатка еды, высокой температуры нематода *C. elegans* в онтогенезе способна вместо перехода из личиночной стадии L2 в стадию L3 превратиться в дауэр (Ld). У дауэров редуцируется пищеварительный тракт, замирает развитие гонад, накапливаются синтезированные *de novo* липиды, останавливается сокращение глотки, формируется плотная кутикула, закрывающую ротовое отверстие. За счет этих изменений у нематоды появляется устойчивость к различным детергентам, в том числе к SDS. Для всех этих изменений требуется активный процесс аутофагии. Для того чтобы выяснить роль сестрина в образовании дауэров был проведен тест на устойчивость к SDS. После 5 дневного голодания, когда популяция должна превратиться в смесь взрослых нематод, неразвившихся личинок и дауэров, проводили обработку SDS (таблица 1).

Таблица 1. Выживание нематод после SDS теста.

Штамм	% выживших нематод после 5 дней голода и последующей 30 минутной экспозиции в 1% SDS
RB2325	0,00%
IE24589	1,07%
N2 cSESN PHKi	5,48%
N2	31,00%
RB2325-SESN-1-expr	23,48%

В результате проведенного теста было установлено, что сестрин необходим для формирования SDS устойчивых дауэров. У нематод в течении всей жизни активно сокращается глотка, что хорошо видно под микроскопом, в то время как у дауэров глотка не сокращается, что позволяет легко идентифицировать их на стандартной чашке. При микроскопическом исследовании среди мутантных штаммов не удалось найти личинок с остановившейся глоткой, что вместе с данными SDS теста может говорить о том, что сестрин имеет критическое значение в процессе формирования дауэров в условиях голодания на стадии перехода между стадиями L2 и L3.

На данный момент известны три сигнальных пути, отвечающие за развитие дауэров. Это сигнальный путь *daf-2 – daf-15 – daf-16*, эквивалент сигнального пути IGF1-Akt-mTOR-FOXO у человека, сигнальный путь *daf-1 – daf-4 – daf-7 – daf-8 – daf-14*, эквивалент сигнального пути TGFβ-Smad и гуанил-циклазный сигнальный путь, связанный с обоими описанными выше сигнальными путями и с феромоновой сенсорикой. Известны *ts*-мутанты по генам этих сигнальных путей, приводящие к развитию дауэров при температуре 25⁰C (дауэр-конститутивные штаммы). Для того, чтобы выяснить, в каком пути образования дауэров участвует ген *cSESN*, нами было проверено образование дауэров при подавлении гена *cSESN* путем РНК-интерференции у дауэр-конститутивных штаммов, которые при температуре 25⁰C развиваются в дауэры. Это штаммы CB1370 (несет мутацию в гене *daf-2*, участнике сигнального пути *daf-2-daf-15-daf-16*), штаммы DR40, CB1364, AG50, CB1393 и DR77 (несут мутации в генах, соответственно, *daf-1, daf-4, daf-7, daf-8* и *daf-14*, участниках сигнального пути *daf-1-daf-4-daf-7-daf-8* и *daf-14*), штамм DR183 (несет мутацию в гене *daf-11*, участнике гуанил-циклазного сигнального пути) (таблица 2)

Таблица 2. Образование дауэров у дауэрконститутивных штаммов при подавлении сестрина

Штамм	Ген	Сигнальный путь	Наличие взрослых животных при 25 ⁰ C
CB1370	<i>daf-2</i>	IGF1-Akt-mTOR-FOXO	-
DR40	<i>daf-1</i>	TGFβ-Smad	-
CB1364	<i>daf-4</i>	TGFβ-Smad	-

AG50	<i>daf-7</i>	TGFβ-Smad	-
CB1393	<i>daf-8</i>	TGFβ-Smad	+
DR77	<i>daf-14</i>	TGFβ-Smad	-
DR183	<i>daf-11</i>	гуанил-циклазный сигнальный путь	+

3.4 Роль гена сестрина в гомеостазе мышц

Известно, что редокс сигнальные пути участвуют в процессе миогенеза, а повышенный уровень АФК может приводить к повреждению миофибрилл и гибели миоцитов. Снижение уровня аутофагии вызывает раннее формирование и увеличение числа белковых полиглютаминовых агрегатов, а также усугубляет полиглютамин-индуцированную дисфункцию мышц. Для оценки участия сестрина в этих процессах использовался штамм PD4251, несущий в ядрах миоцитов генетический конструкт, экспрессирующий белок mio-3, сшитый с GFP (*mio-3::GFP* fused). Под флуоресцентным микроскопом ядра миоцитов видны как светящиеся точки, что облегчает их подсчет (рисунки 6 и 6). Сестрин у этого штамма был подавлен РНК-интерференцией.



Рисунок 6. Локализация GFP в миоцитах нематод штамма PD4251. Увеличение 400х.

Мышечная дегенерация

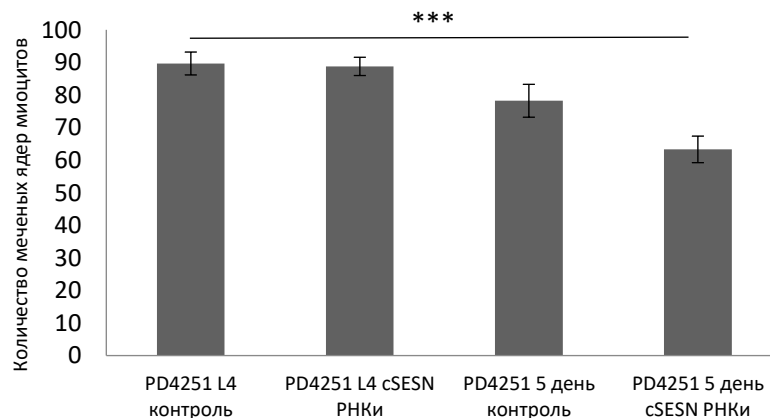


Рисунок 7. Анализ гибели миоцитов с возрастом. Достоверность отличия показателей в группах животных дикого типа к соответствующим показателям в группах с подавленным или делетированным сестрином: $p < 0,001$.

На 5 день жизни нематод наблюдается более быстрое снижение количества миоцитов при отсутствии функционального сестрина.

3.5. Влияние сестрина на продолжительность жизни нематоды

Из известных на данный момент функций сестринов следует, что они могут воздействовать на продолжительность жизни. Этот постулат нами был проверен в серии экспериментов. Нами была определена продолжительность жизни нематоды дикого типа (N2) и мутанта с делецией в гене

сестрина(RB2325) в зависимости от ограничения питательных веществ. Выяснилось, что если в условиях ограничения еды нематоды дикого типа живут в среднем на 40,23% дольше, чем при питании ad libitum, то средняя продолжительность жизни мутантных нематод с делецией гена сестрина при нормальном кормлении оказывается на 11,04 % короче, а голодание продлевает жизнь всего на 6,2 % (рисунок 8, таблица 4).

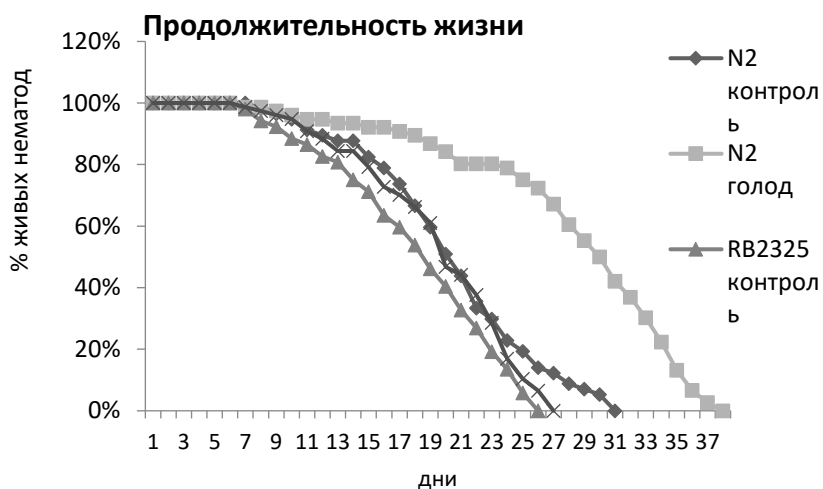


Рисунок 8. Продолжительность жизни нематод при отсутствии пищи.

Таблица 4. Средние и максимальные показатели продолжительности жизни

Штамм	Группа	Средняя продолжительность жизни ± ошибка среднего	Изменение по отношению к контролю %	Изменение в % продолжительности жизни в контроле в равнении с диким типом
N2	контроль	19,91±2,64	100,00%	100,00%
	голод	27,92±3,20	140,23%	
RB2325	контроль	17,71±2,46	100,00%	88,95%
	голод	18,81±2,12	106,21%	

Достоверность отличия средних показателей между группами RB2325 и N2(голод) : $p < 0,0004$; между группами между группами RB2325 и N2 (контроль) $p < 0,0003$; между группами RB2325 (контроль) и RB2325 (голод) : $p < 0,03$; между группами N2 (контроль) и N2 (голод) : $p < 0,0005$

3.6 Значение сестрина в регуляции активность TOR-киназы и индукции аутофагии

Известно, что в основе способности нематоды не только выживать но и увеличивать продолжительность жизни при голодании лежит подавление активности TOR и активация аутофагии. Участие сестрина нематоды в этих процессах исследовалось нами с помощью оценки аутофагии, и оценки степени фосфорилирования мишени TOR, белка rpS6.

Для оценки индукции аутофагии нами был использован штамм нематод, несущий генетический конструкт, экспрессирующий аналог белка LC3 млекопитающих, белок LGG-1, соединенный с GFP (слитой белок LGG::GFP) под своим промотором. Этот конструкт экспрессируется равномерно по всему телу, в случае образования аутофагосом, GFP сигнал концентрируется на поверхности мембраны аутофагосом, она становится видна как светящаяся точка, что облегчает их визуализацию и подсчет (Рисунок 9). Для определения влияния сестрина на индукцию аутофагии его экспрессию подавляли РНК-интерференцией. Подсчет аутофагосом проводился в клетках гиподермального шва нематод в стадии L3, который выглядит как цепочка клеток по обеим сторонам тела. Размеры этих клеток позволяют сравнительно легко находить внутри них аутофагосомы, меченные GFP (Рисунок 9).



Стрелкой обозначена аутофагосома

Рисунок 9. Клетки гиподермального шва выглядят как две цепочки вдоль тела нематоды.

Животные экспонировались в течении 16 часов в условиях, описанных для оценки продолжительности жизни. Выяснилось, что голод активирует накопление аутолизосом у дикого типа нематод на 416 %, а при отсутствии функционального сестрина всего на 61% (рисунок 10).

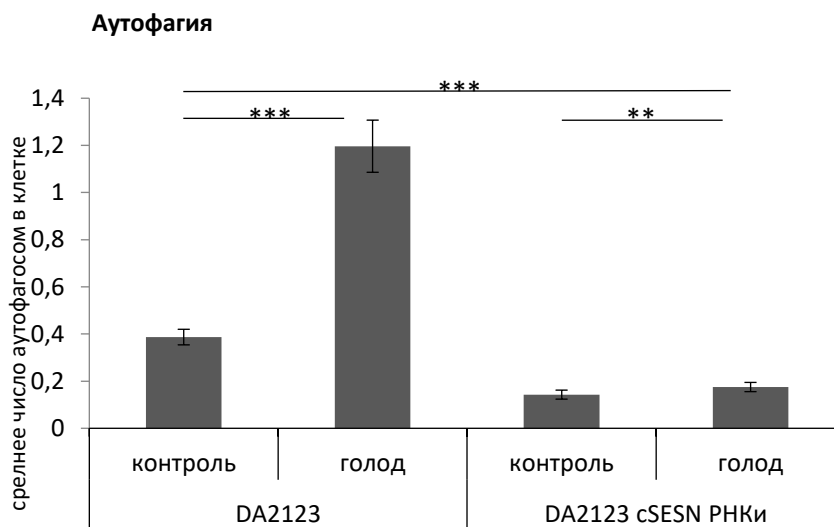


Рисунок 10. Анализ аутофагии, активированной голодом. Достоверность отличия средних показателей между группами DA2123 и DA2123 cSESN РНКи: контроль - $p < 0,0018$; голод - $p < 0,0003$.

Полученный результат был подтвержден с помощью иммуноблоттинга с лизатами, полученными из нематод штамма DA2123, также помещенных в условия голодания. На блотте с антителами против GFP (Рисунок 11) видно, что при голодании нематод дикого типа происходит значительная стимуляция аутофагии, чего не наблюдается у нематод с подавленным сестрином. Это означает что сестрин нужен для адекватной активации аутофагии в условиях голодания.

На блоте с антителами против фосфорилированной формы рибосомального белка S6 (rpS6) видно, что у мутанов нематод с делецией гена сестрина фосфорилирование rpS6 во время голодания не снижается, тогда как у голодных "диких" нематод оно практически полностью прекращается (Рисунок 11). Это означает, что сестрин нужен для подавления активности TOR-киназы в условиях голодания.

Далее была проведена оценка состояния тканей в области глотки нематоды, как места, наиболее сильно подвергающегося воздействию аутофагии при голодании. У нематод этого рода глотка в течении жизни постоянно сокращается. В условиях голода прилежащие ткани в прямом смысле самопоедаются, очевидно для обеспечения мышц глотки необходимой для выживания энергией, а это дает возможность оценить аутофагию на микроскопическом уровне по последствиям процесса

самопоедания. На снимке среза глотки, полученного с помощью электронной микроскопии, видно разрежение прилегающих к мышцам тканей у нематод дикого типа, у делеционных по сестрину мутантов этого не наблюдается (Рисунок 12). Видимо, это явление лежит в основе описанного в литературе замедления движений глотки нематоды и снижения локомоторной активности. Мутантные по сестрину нематоды в условиях голода, по-видимому, неспособны индуцировать аутофагию в клетках глотки, что с одной стороны, сохраняет глоточные ткани в более интактном состоянии, а с другой, не позволяет нематодам использовать ресурсы, возникающие путем аутофагии, для обеспечения энергетических потребностей в условиях голодания.

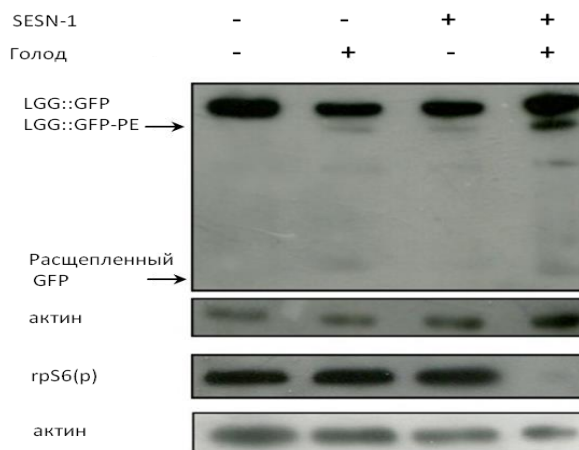


Рисунок 11. Иммуноблоттинг лизатов нематод, окрашенный против GFP и фосфорилированной формы grS6. В качестве контроля нагрузки использовались антитела против актина.

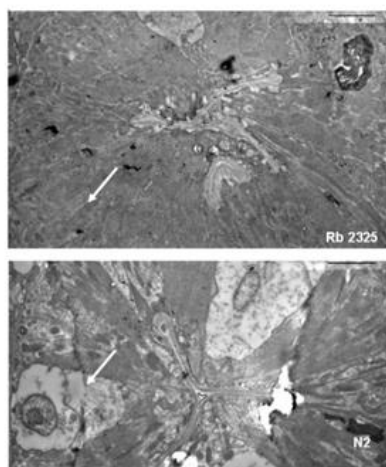


Рисунок 12. Срез глотки, полученный с помощью электронной микроскопии. Разрежение прилегающих к мышцам тканей обозначено стрелкой.

3.7. Воздействие торина 2 и рапамицина на продолжительность жизни нематоды

Наблюдаемые эффекты при отсутствии сестрина прямо указывают на то, что сестрин является важным регулятором сигнального пути сTOR. Чтобы убедиться в этом, мы использовали наиболее известный ингибитор TOR рапамицин, и уже в первых экспериментах убедились, что хотя рапамицин и продлевает жизнь нематод, он не является строгим ингибитором сTOR. Причиной такой слабой активности рапамицина на нематоды может являться природа этого антибиотика, который вырабатывается почвенными бактериями. Нематоды же обитают в почве, и, очевидно, в ходе эволюции выработали относительную невосприимчивость к рапамицину. Это заставило нас искать более подходящий ингибитор TOR, эффективно действующий на нематоды *C.elegans*.

Мы выбрали в качестве кандидата ингибитор TOR второго поколения торин-2, действующий непосредственно на активный АТФ-связывающий центр протеинкиназы TOR и подавляющий у

млекопитающих оба комплекса, mTORC1 и mTORC2.

Для стартового эксперимента мы провели оценку продолжительности жизни под воздействием торина-2. Для этого нематод на личиночной стадии L4 высаживали на чашки, в агаровую среду которых был добавлен торин-2 и для сравнения - рапамицин, в серийных разведениях. Кроме этого, в качестве активного контроля использовались депривация еды и РНК-интерференция ортолога гена TOR у нематоды, гена *let-363* или *cTOR*. Выяснилось, что торин-2 в максимально эффективной дозе в 25 нМ/мл способен увеличивать среднюю продолжительность жизни нематоды на 19,77 %, рапамицин, в свою очередь, в дозе 100 мкМ вызывает увеличение на 22,79%, РНК-интерференция *cTOR* - на 20,15% , а голодание - на 24,82%, по сравнению с контрольным штаммом N2 при нормальном питании. Увеличение максимальной продолжительности жизни составило в случае торина-2, рапамицина и РНК-интерференции *cTOR* по приблизительно 22%, в случае голодания – 25,92% (Рисунки 13 и 14; Таблица 5).

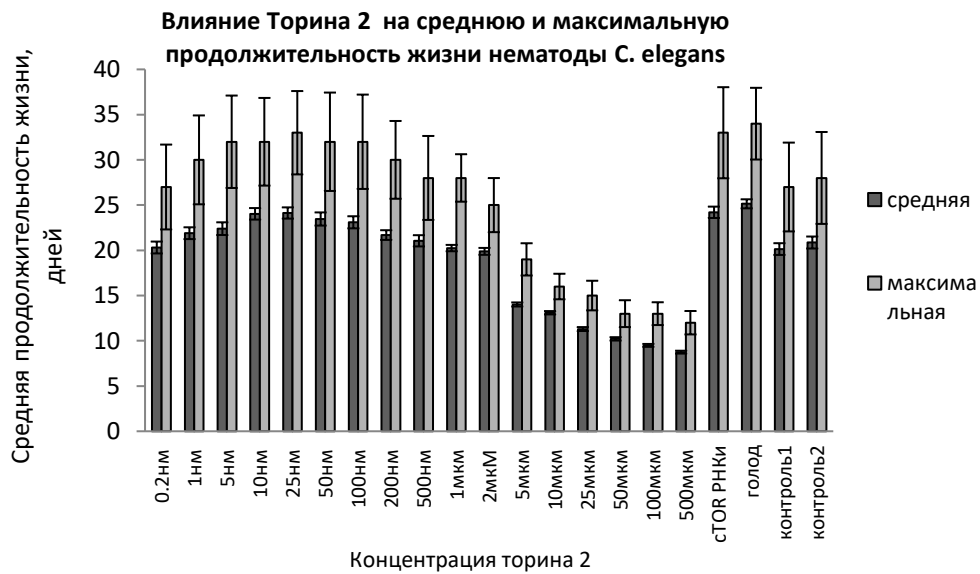


Рисунок 13. Исследование действия серийных разведений торина 2 на продолжительность жизни. Контроль2 – нематоды под действием рнк-интерференции с пустым вектором.

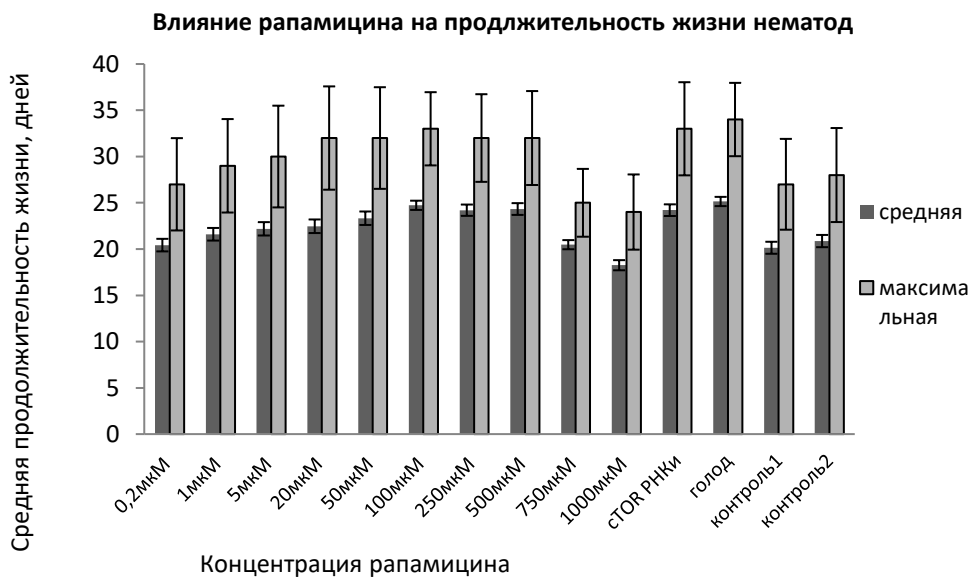


Рисунок 14. Исследование действия серийных разведений торина 2 на продолжительность жизни. Контроль2 – рнк-интерференция с пустым вектором.

Таблица 5. Увеличение продолжительности жизни нематод дикого типа под действием оптимальных концентраций торина 2 и рапамицина.

	контроль	25нМ торин 2	100мкМ рапамицина	сTOR РНКи
Средняя продолжительность жизни	20,1403509	24,1272727	24,7301587	24,203125
Изменение, %		+19,77%	+22,79%	+20,15%
максимальная продолжительность жизни	27	33	33	33
Изменение, %		+22,22%	+22,22%	+22,22%

Достоверность отличия показателей в группе животных контроля к соответствующим показателям в группах, обработанных торинном 2 - $p < 0,001$; рапамицином - $p < 0,003$.

3.8 Воздействие торина 2 на продолжительность жизни нематод разных возрастов

Наиболее интересной нам виделась возможность увеличения средней и максимальной продолжительности жизни нематод разных возрастов с помощью выявленной оптимальной концентрации торина-2. Для этого выращенных синхронно нематод переносили со стандартной среды на среду с добавленным торинном-2 в концентрации 25нмоль/мл, по достижении ими возраста 4, 9, 13 и 18 дней. (Рисунок 15; Таблица 6). Выяснилось, что торин-2 способен продлевать среднюю и максимальную продолжительность жизни нематод даже при его добавлении в возрасте 18 дней, учитывая, что в среднем нематоды живут около 20 дней.

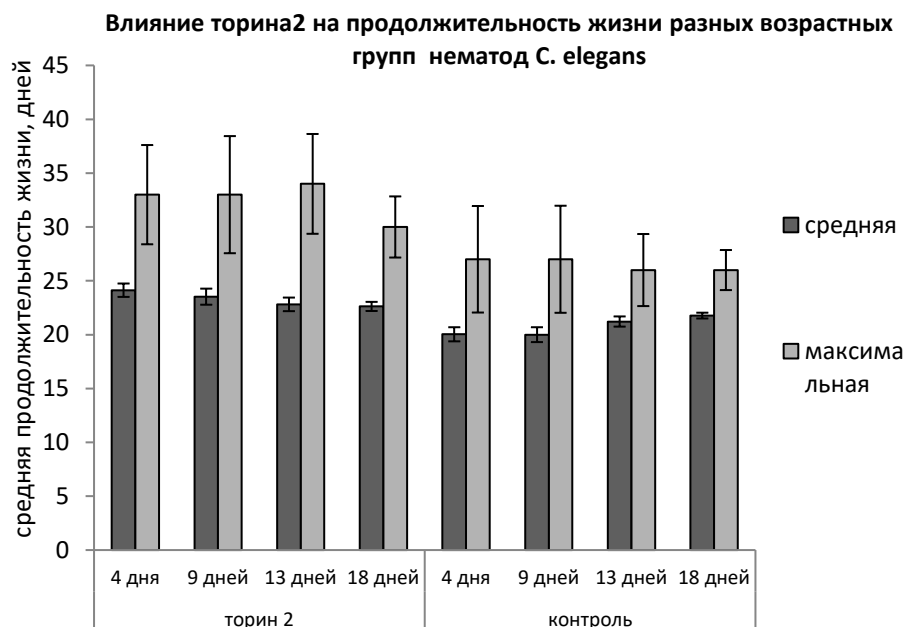


Рисунок 15. Увеличение средней и максимальной продолжительности жизни нематод разного возраста под действием торина 2 в концентрации 25нмоль/мл. Достоверность отличия показателей в группе животных контроля к соответствующим показателям в возрастных группах, обработанных торинном 2: 4 дня - $p < 0,0005$; 9 дней - $p < 0,0001$; 13 дней - $p < 0,003$; 18 дней - $p < 0,004$.

Таблица 6. Увеличение продолжительности жизни нематод дикого типа под действием оптимальных концентраций торина-2 в разном возрасте.

возраст	4 дня	9 дней	13 дней	18 дней
средняя под действием торина 2	24,12727	23,5283	22,81481	22,62222
средняя в контроле	20,03509	20	21,22	21,77083
изменение	+20,4%	+17,64%	+7,5%	+3,9%
максимальная под действием торина2	33	33	34	30
максимальная в контроле	27	27	26	26
изменение	+22,22%	+22,22%	+30,76%	+15,38%

3.9. Воздействие торина-2 и рапамицина на аутофагию у нематод

Для изучения механизма действия торина-2 в нематоде оценивалась индукция аутофагии. Для этого использовался штамм нематод, несущий в клетках генетический конструкт, экспрессирующий аналог белка LC3 млекопитающих, сшитый с GFP (LGG-1::GFP слитой белок), как и при исследовании роли сестрина в регуляции аутофагии. Количественная оценка проводилась с помощью подсчета аутофагосом в клетках гиподермального шва нематод в личиночной стадии L3 (Рисунок 16). Для подсчета аутофагосом нематод штамма DA2123 проводили 100 мкМ торина-2 и рапамицина в течении 16 часов, а для контроля нематод подвергали 16 часовому голоду а также с помощью РНК-интерференции подавляли сTOR, так как известно, что активность TOR вызывает подавление аутофагии.

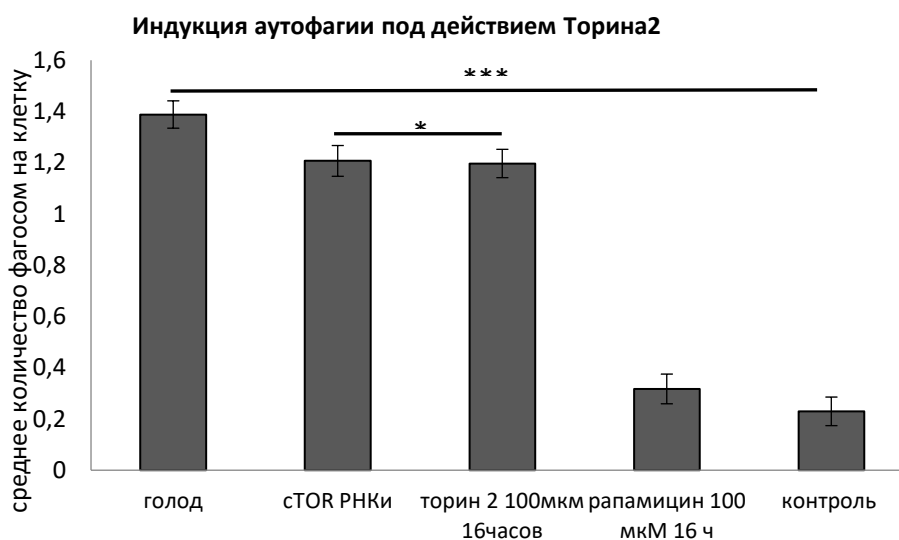


Рисунок 16. Торин 2 активирует аутофагию в клетках гиподермального шва. Достоверность отличия показателей в группах: * - $p < 0,05$; *** - $p < 0,001$.

Выяснилось, что в этом эксперименте голодание приводит к увеличению количества аутолизосом на 506% больше, чем в контроле; при воздействии РНК-интерференции против сTOR и торина-2 - на 420%, при воздействии рапамицина - всего на 38%.

Для определения влияния торина и рапамицина на активность TOR-киназы были получены лизаты из нематод, культивированных в синхронной культуре на твердой среде с добавлением в агар 5, 10, 25, 50 и 100 нМ/мл торина-2 и 50, 100, 250, 500 и 1000 мкМ/мл рапамицина в течении 16 часов при 20°C. Выбор дробных концентраций ингибиторов имел своей целью выявление с помощью иммуноблоттинга оптимальных концентраций торина-2 и рапамицина, способных оказывать влияние на активность TOR-киназы. Полученные лизаты были тестированы иммуноблоттингом с антителами против GFP, как описано в разделе "материалы и методы". Была обнаружена зависимость от дозы торина-2 индукция аутофагии с образованием расщепленного белка GFP. Выявлено также фосфорилирование белка grS6, которое подавляется торин-2, также в зависимости от его дозы. Интенсивность аутофагии, накопления расщепленного GFP и динамику фосфорилирования grS6 можно оценить по соотношению этих показателей к актину, нормализованному к контролю (Рисунок 17). В случае рапамицина также наблюдались эффекты, зависящие от его дозы, хотя процесс аутофагии активировался незначительно, и не проходил через все стадии (не образовывались фрагменты расщепляемого GFP). Примечательно, что рапамицин практически не действовал на активность TOR-киназы - лишь на очень высокой дозе в 1000 мкМ наблюдалось небольшое снижение фосфорилирования белка grS6, которое возможно является неспецифическим (Рисунок 18).

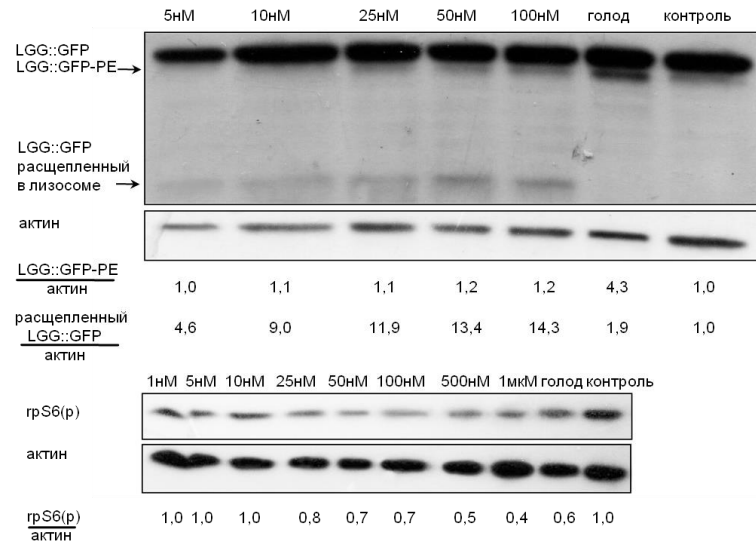


Рисунок 17. Активация аутофагии торином 2.

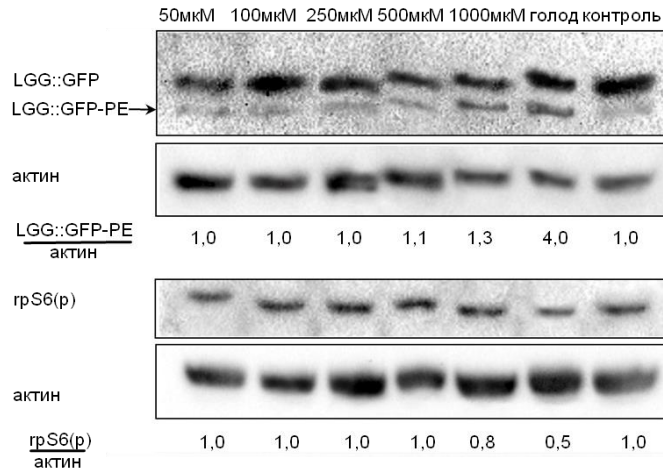


Рисунок 18. Активация аутофагии рапамицином.

3.10 Воздействие ингибиторов TOR торина-2 и рапамицина на онтогенез нематод

Известно, что подавление сTOR у нематоды приводит к аресту развития на стадии личинок L3. Это позволяет проведение оценки воздействия ингибиторов сTOR путем отслеживания прохождения личиночных стадий, от яйца до взрослого животного. Нематод в стадии L1 помещали на агар, содержащий торин-2 в серийных разведениях. Для сравнения использовалась среда с добавлением различных концентраций рапамицина, контрольная среда, а также среда с РНК-интерферирующими бактериями против сTOR. Обнаружено, что торин-2 в концентрации 1мкМ/мл в 2 раза замедляет развитие животного, а в концентрации 2,5 мкМ/мл полностью останавливает его развитие, тогда как рапамицин замедляет развитие в концентрации 2000мкМ/мл в 1,5 раза, а при более высоких концентрациях различить действие рапамицина и действие растворителя (ДМСО) невозможно из-за проявления его токсичности.

Нами также была проведена оценка обратимости воздействия высоких доз рапамицина и торина-2, для чего через 4 суток после добавления ингибиторов на стадии L1 (1000 мкМ/мл рапамицина или 100 и 250мкМ/мл торина-2) нематод переносили на чашки с кормом и без ингибиторов. Было установлено, что задержка онкогенеза, вызванная торин-2 и рапамицином является обратимой. При возвращении на обычную среду нематоды возобновляют развитие и переходят в стадию взрослого животного, также, как в контроле. Кроме того, установлено, что торин-2 останавливает развитие нематоды в личиночной стадии L1, что указывает на его способность подавлять сTOR-независимую программу развития между личиночными стадиями L1 и L3 (Таблицы 7 и 8).

Таблица 7. Воздействие торина2 на онтогенез нематоды.

Группы	Время (дни)									
	2 день	3 день	4 день	5 день	6 день	7день	8день	10день	12день	16день
Концентрация торина2 /мл										
50 нМ	L1,L2	L3,L4	я, L4, взр							
200 нМ	L1,L2	L3,L4	я, L4, взр							
1 мкМ	L1	L1	L2,L3	L2,L3	L3,L4	я, L4, взр				
2,5 мкМ	L1	L1	L1	L1	L1	L1	L1	L1	L1	L1
5 мкМ	L1	L1	L1	L1	L1	L1	L1	L1	L1	L1
10 мкМ	L1	L1	L1	L1	L1	L1	L1	L1	гибель	
25 мкМ	L1	L1	L1	L1	L1	L1	гибель			
50 мкМ	L1	L1	L1	гибель						
100 мкМ	L1	L1	L1	гибель						
250 мкМ	L1	L1	гибель							
500 мкМ	гибель									
Снятые с 100мкМ				L2,L3	L3,L4	я, L4, взр				
Снятые с 250 мкМ			гибель							
контроль	L1,L2	L3,L4	я, L4, взр							
cTOR рнк-интерференция	L3	L3	L3	L3	L3	L3	L3			
голод	L1	L1	L1	L1	L1	L1	L1			

Я- яйца, L1,2,3 – последовательные личиночные стадии в развитии нематоды, взр-взрослое животное, гибель-на чашке нет живых нематод. Интерференция cTOR приводит к остановке развития нематоды на стадии L3.

Таблица 8. Воздействие рапамицина на онтогенез нематоды.

Группы	Время (дни)						
	2 день	3 день	4 день	5 день	6 день	7день	8день
Концентрация рапамицина /мл							
100мкМ	L1,L2	L3,L4	я, L4, взр				
200мкМ	L1,L2	L3,L4	я, L4, взр				
500мкМ	L1	L3,L4	я, L4, взр				
1000мкМ	L1	L2,L3	L3,L4	я, L4, взр			
2000мкМ	L1	L1,L2	L2,L3	L3,L4	я, L4, взр		
5000мкМ	L1	L1	L1,L2	L1,L2	L1,L2	L3	гибель
10000мкМ	L1	L1	L1	L1	L1	гибель	
контроль	L1,L2	L3,L4	я,L2,L3, взр				
Снятые с 1000мкМ L1,L2				L2, L3	L3,L4	я, L4, взр	
cTOR рнк-интерференция	L3	L3	L3	L3	L3	L3	L3
голод	L1	L1	L1	L1	L1	L1	L1

Я- яйца, L1,2,3 – последовательные личиночные стадии в развитии нематоды, взр-взрослое животное, гибель-на чашке нет живых нематод.

Отметим, что рапамицин практически не растворяется в воде, поэтому для приготовления 100мМ/мл стокового раствора в качестве растворителя был использован диметилсульфоксид (ДМСО). Поскольку в высоких дозах ДМСО может обладать токсичностью, было проверено воздействие самого ДМСО на жизненный цикл нематоды и на его способность активировать

аутофагию. Для этого вначале была тестирована потенциальная токсичность ДМСО. Нематод в личиночной стадии L1 помещали на чашки с серийными разведениями диметилсульфоксида, от 1% до 9%. Через трое суток проводили оценку стадий развития (Таблица 9).

Таблица 9. Воздействие диметилсульфоксида на онтогенез нематоды.

Группы	Время (дни)				
	2 день	3 день	4 день	5 день	6 день
Концентрация ДМСО %					
1% ДМСО	L1,L2	я, L4, взр			
2% ДМСО	L1,L2	L3,L4	я, L4, взр		
3% ДМСО	L1,L2	L3,L4	я, L4, взр		
4% ДМСО	L1,L2	L3,L4	я, L4, взр		
5% ДМСО	L1,L2	L3,L4	я, L4, взр		
6% ДМСО	L1,L2	L3,L4	я, L4, взр		
7% ДМСО	L1,L2	L1,L2	L3,L4	я, L4, взр	
8% ДМСО	L1,L2	L1,L2	L3,L4	я, L4, взр	
9% ДМСО	L1	L1	L1	L1,L2	гибель
10% ДМСО	L1	L1	L1	L1,L2	гибель

Я- яйца, L1,2,3 – последовательные личиночные стадии в развитии нематоды, взр-взрослое животное, гибель-на чашке нет живых нематод.

Как видно из приведенных результатов, в диапазоне концентраций ДМСО от 2% до 6% наблюдается незначительное торможение развития нематод, но в концентрациях более 9% ДМСО проявляет смертельную токсичность. 9% ДМСО содержится в дозе рапамицина соответствующей 9000 мкМ. Таким образом, данные о токсичности высоких доз рапамицина, приведенные в Таблице 9, следует оценивать как сочетание токсичности рапамицина и ДМСО.

Таким образом, нами было установлено, что при концентрациях рапамицина выше 9000 мкМ разделение вклада рапамицина и его растворителя ДМСО не представляется возможным. Как уже отмечалось, активные концентрации рапамицина способны ингибировать киназу TOR в клетках млекопитающих находятся в суб-наномолярном диапазоне, т.е. в миллионы раз меньше по сравнению с концентрациями, оказывающими влияние на TOR нематод. Поэтому полученные данные с рапамицином надо рассматривать с осторожностью, не исключая возможность неспецифического действия. Для нематод наиболее подходящим ингибитором TOR может считаться торин-2 или его производные.

3.11. Определение способности вакцинного штамма полиовируса 1 типа вызывать прямое онколитическое действие в отношении опухолевых клеток человека на модели опухолевых ксенотрансплантатов клеток глиобластомы человека, культивируемых на иммунодефицитных мышях.

В рамках отдельной работы, связанной обязательством лаборатории по разработке проекта финансируемого Госконтрактом Министерства образования и науки (уникальный идентификатор проекта RFMEFI60714X0014), во время выполнения диссертационной работы была проведена оценка динамики онколитического действия вакцинного штамма полиовируса 1 типа на модели подкожных ксенотрансплантатах клеток глиобластомы человека, культивируемых в виде подкожных опухолей на бестимусных мышях. Хотя эта работа предметно не связана с темой диссертационного исследования, она позволила освоить ряд методов молекулярной и клеточной биологии и решить конкретную исследовательскую задачу. Поэтому уместно вынесение на защиту диссертационной работы выводов, полученных в ходе выполнения этого проекта в качестве отдельного пункта.

Целью проведенной работы было установление эффективности с которой происходит заражение подкожных ксенотрансплантатов глиобластомы человека U87MG при внутривенном введении онколитического энтеровируса (вакцинного штамма вируса полиомиелита 1 типа), а также выявление динамики прямого онколитического действия вируса и динамики присутствия в организме мыши онколитического вируса в зависимости от наличия в ее организме опухолевых

клеток.

Клетки U87MG (ATCC HTB-14) наращивали в виде монослойной культуре, снимали с пластика и приготавливали суспензию как описано в разделе "материалы и методы". Клетки вводили 4 недельным бестимусным иммунодефицитным мышам линии *Balb/c Nu/Nu* подкожно, в область заднего бедра, в количестве 10^6 клеток в 0,1 мл. Рост опухолей становился заметным начиная с 12-16 дней после введения. По достижении опухолями размера фасоли ны (приблизительно 10 мм), что в этом опыте соответствовало 24 дню после инъекции клеток, в хвостовую вену вводили полиовирус 1 типа в объеме 0,2 мл физиологического солевого раствора в дозах 105, 106 и 107 БОЕ (бляшко-образующих единиц). Имелись также две контрольные группы мышей, одна - несущая опухоли, но без введения вируса, другая - не несущая опухоли, с введением 107 БОЕ вируса.

Спустя различное время после введения проводили забор образцов крови для выделения вируса, а также регулярно промеряли размеры опухолей и наблюдали за состоянием мышей. Каждая группа состояла из 15 мышей, общее количество опухолей было равно 30.

В таблице приведены результаты промеров опухолей с высчитыванием объема в кубических миллиметрах по формуле $\text{объем} = \text{длина} \times \text{ширина}^2 \times 0.5$, а также титры вируса в крови в разное время после введения. Определение титров проводилось путем заражения серийными разведениями крови, полученной из хвостовой вены, чувствительных культур клеток рабдомиосаркомы человека RD.

Таблица 10. Динамика роста и деградации опухолей клеток U87MG при введении разных доз вакцинного полиовируса 1 типа, а также титры вируса в крови.

Группы мышей без опухолей	День 0		День 5		День 10		День 15		День 20	
	Объем Опухоли, мм ³	Титр вируса в крови, БОЕ	Объем Опухоли, мм ³	Титр вируса в крови, БОЕ	Объем Опухоли, мм ³	Титр вируса в крови, БОЕ	Объем Опухоли, мм ³	Титр вируса в крови, БОЕ	Объем Опухоли, мм ³	Титр вируса в крови, БОЕ
Без опухоли	X	10^2	X	нет	X	нет	X	нет	X	нет
без вируса	920±22	нет	1243±54	нет	1576±48	нет	6/15 1987±102	нет	Все погибли	нет
Вирус 10^5	952±38	0	948±56	10^2	634±59	10^2	108±32	10^2	рубец?	нет
Вирус 10^6	1012±32	10	821±42	10^2	433±46	10^2	104±45	10^2	рубец?	нет
Вирус 10^7	987±46	10^2	876±32	10^3	388±52	10^2	98±12	нет	рубец?	нет

Обращает на себя внимание тот факт, что в диапазоне примененных доз вируса (10^5 , 10^6 и 10^7 , БОЕ) наблюдался явный онколитический эффект, выразившийся вначале в остановке роста опухолей, а затем постепенном уменьшении их объемов, вплоть до полного исчезновения. На 20 день после введения на месте опухоли оставалось лишь хорошо прощупываемое уплотнение, которое соответствует рубцовой ткани. Дальнейшее наблюдение за мышами в течение двух месяцев не выявило вторичного роста, в то время как вирус в крови уже не определялся. Из групп, зараженных вирусом выжило 14 из 15 мышей, в то время как в контрольной группе мышей, несущих опухоли, на 15 день живых оставалось 6 мышей, к 20 дню погибли все мыши.

Динамика обнаружения вируса была также примечательна. В группе контрольных мышей, не несущих опухоли, вирус обнаруживался лишь непосредственно в день введения (через 2 часа). Далее ни один из замеров присутствия вируса не выявил. При введении трех доз вируса через 2 часа вирус обнаруживался только у мышей с введенными 10^6 БОЕ (при заражении 10 мкл неразведенной крови) и 10^7 БОЕ (при разведении 1 : 100). Однако в дальнейшем вирус выделялся уже у всех зараженных мышей, приблизительно на одинаковом уровне (при разведении 1 : 100), вплоть до 20 суток когда на фоне отсутствия видимых опухолей вирус в крови больше не определялся.

Таким образом, в результате проведенного исследования нами было установлено что подкожные ксенографты эффективно заражаются онколитическим вирусом при внутривенном введении доз вируса начиная с 10^5 БОЕ. Из этого можно заключить что в модели иммунодефицитных мышей инактивация вируса при внутривенном введении идет сравнительно медленно, что позволяет вирусным частицам проникнуть в опухоль и начать процесс инфекции восприимчивых опухолевых клеток. Разрушение опухоли под действием вируса сопровождается выбросом инфекционного вируса в кровь, что обеспечивает постоянное присутствие вирусных частиц на уровне, достаточном для реинфекции оставшихся опухолевых клеток. Очевидно, персистенция вируса в организме мыши зависит от присутствия восприимчивых к вирусу опухолевых клеток поскольку при введении даже высокой дозы вируса мышам, не несущим опухоли, уже через 5 суток вирус в крови не обнаруживается, в то время как он присутствует в крови мышей несущих опухоли строго до времени их полного исчезновения, после чего вирус в крови также перестает определяться. Было также установлено, что ксенографты глиомных клеток человека в бестимусных мышах является эффективной и чувствительной системой для изучения вирусной доставки в опухоль, что в дальнейшем может быть использовано для испытания других способов введения, снижающих исходную нагрузку вирусом и повышающих эффективность проникновения вглубь опухоли, например, при использовании клеточных носителей, зараженных *ex vivo* вирусом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе был исследован вклад ортолога сестрина 2 млекопитающих гена *sESN* (*sestrin-1*) в регуляцию гомеостаза в нематоде *Caenorabditis elegans*. Мы обнаружили, что серьезно сказывается на жизнеспособности нематоды, ее способности выживать в условиях разнообразных стрессов и в в условиях голода. Сестрин необходим нематоде также для возможности избежать ухудшений условий среды с помощью перехода в онтогенезе в стадию дауэровской личинки. Мы высказали предположение о том, что сестрин должен взаимодействовать с TOR нематоды, что подтвердилось в ходе экспериментов. При изучении TOR нематоды мы также описали действие ингибитора TOR второго поколения торина 2 на нематоду. Данная работа демонстрирует роль сестрина в гомеостазе нематоды открывает возможности для дальнейшего исследования вопроса о взаимодействии сестрина и участников сигнального пути TOR, а также более детального изучения молекулярных механизмов.

В рамках отдельного проекта, связанного с выполнением лабораторией Госконтракта Министерства образования и науки RFMEFI60714X0014, изучена динамика онколитического действия вакцинного штамма полиовируса 1 типа на подкожные опухолевые ксенотрансплантаты клеток глиобластомы человека на иммунодефицитных мышах и динамика присутствия в крови животных вируса, при однократном введении препарата в хвостовую вену. Установлено, что для достижения онколитического эффекта достаточно введение 10^5 инфекционных единиц вируса, причем полное исчезновение опухолей, достигших к началу терапии размера 10 мм происходит в течение 20 суток. Присутствие вируса в крови животного наблюдается все время, пока в организме присутствуют опухолевые клетки и его количество не зависит от начальной дозы вводимого вируса. В контрольной группе мышей, не несущих опухоли, при введении в хвостовую вену вирус в крови переставал определяться уже на следующий день после введения. Полученный результат указывает на роль репликации вируса в опухолевых клетках глиобластомы в достижении онколитического действия.

ВЫВОДЫ

1. Установлено участие сестрина в поддержании метаболического и энергетического гомеостаза у нематод *C. elegans*. Инактивация гена сестрина у нематоды приводит к большему размеру взрослых особей и более поздней остановкой роста.
2. Отсутствие активности сестрина сопровождается снижением выживаемости голодающих личинок ранних стадий, а также понижением устойчивости к окислительному стрессу
3. Активность сестрина необходима для образования дауэров, которые обеспечивают длительное выживание при неблагоприятных условиях. Эта активность сестрина проявляется во взаимодействии с TGF β -Smad и гуанилат-циклазными сигнальными путями образования дауэров.
4. Активность сестрина необходима для индукции аутофагии и мобилизации внутренних ресурсов в условиях ограничения питания
5. Активность сестрина необходима для увеличения продолжительности жизни в условиях ограничения питания. Отсутствие сестрина приводит к укороченному времени жизни нематод и нивелированию эффекта увеличения продолжительности жизни при голодании.
6. Активность сестрина важна для предотвращения возрастной деградации мышц у нематод.
7. Синтетический ингибитор TOR-киназы млекопитающих торин-2 является также эффективным ингибитором TOR нематод, продлевая жизнь животных даже в пожилом возрасте в нано-молярном диапазоне концентраций, подавляя фосфорилирование pS6 и активируя аутофагию. Напротив, известный ингибитор TOR рапамицин проявляет активность только при запредельных концентрациях и его специфичность вызывает сомнения.
8. Онколитическое действие вакцинного штамма полиовируса 1 типа на подкожные опухолевые ксенотрансплантаты клеток глиобластомы человека на иммунодефицитных мышьях достигается при введении 10^5 инфекционных единиц вируса.
9. Полиовирус 1 типа вакцинного штамма наблюдается в крови животного все время, пока в организме присутствуют опухолевые клетки и его количество не зависит от начальной дозы вводимого вируса.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи:

1. Singh K., Poteryakhina A. O., **Zheltukhin A. O.**, Bhatelia K., Prajapati P., Sripada L., Tomar D., Singh R., Singh A.K., Chumakov P. M, Singh R. NLRX1 acts as tumor suppressor by regulating TNF- α induced apoptosis and metabolism in cancer cells //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research. – 2015. – Т. 1853. – №. 5. – С. 1073-1086.
2. **Желтухин А. О.**, Чумаков П. М. Повседневные и индуцируемые функции гена p53 //Успехи биологической химии. – 2010. – Т. 50. – С. 447-516.
3. **Zheltukhin A. O.** et al. Persistent Virus Presence during Experimental Oncolytic Virus Therapy in the Model of Subcutaneous Mouse Xenografts of Human Glyoblastoma Multiforme //Journal of Pharmaceutical Sciences and Research. – 2017. – Т. 9. – №. 11. – С. 2224-2226.
4. **Zheltukhin A.O.**, Plyinskaya G.V., Budanov A.V., and Chumakov P.M. Some phenotypic characteristics of nematode *Caenorhabditis elegans* strains with defective functions of the Sestrin (cSesn) gene. //Biomed Pharmacol J. –2018. –11(2).

Авторские свидетельства:

1. **Желтухин А.О.**, Сосновцева А.О., Чумаков П.М. Программный комплекс для анализа дифференциальной экспрессии генных маркеров чувствительности клеток глиобластом к

онколитическому вирусу Сендай, свидетельство о государственной регистрации № 2017611539, дата государственной регистрации 16.12.2016

2. **Желтухин А.О**, Сосновцева А.О. Программный комплекс для анализа экспрессионного профиля клеток злокачественных опухолей головного мозга на основе данных о корреляции уровня экспрессии маркерных генов и чувствительности к онколитическим вирусам, свидетельство о государственной регистрации № 2015618920, дата государственной регистрации 16.11.2015

Тезисы:

1. Poteryakhina, D. Kochetkov, **A. Zheltukhin**. Potential role of NLRX1 as a tumor suppressor and a predictor of sensitivity to oncolytic viruses, // FEBS Journal. – 2015. – Т. 282, Suppl 1. – С.45.
2. Anastasia O. Sosnovtseva, Dmitriy V. Kochetkov, Anastasia V. Lipatova, Darya A. Berzhitskaya and **Andrey O. Zheltukhin**. Genetic markers that predict sensitivity of tumor cells to infection by Sendai virus. // Oncol Cancer Case Rep. – 2015. – Vol.2. - Issue 3, Suppl 1. - С. 79.
3. **Zheltukhin AO**, Kornev AB, Chumakov PM. Investigation of Life Span Extension by Torin-2 in the nematode *Caenorhabditis elegans*. 2nd International scientific conference “Science of the Future” Kazan, 2016, Proceedings of the conference - С. 315.
4. **Zheltukhin AO**, Chumakov PM. Role of gene SESN-1 in life extension of *Caenorhabditis elegans* during food deprivation. // Biochem Anal Biochem. – 2016. – Vol.5. - Issue 5, Suppl 1. - С. 62.