

Новый низкомолекулярный ингибитор киназ Clk нарушает сплайсинг РНК и эффективно убивает нейросферы глиобластомы

Научный руководитель – Павлюков Марат Самвелович

Аксинина Татьяна Евгеньевна

Студент (магистр)

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Биологический факультет, Кафедра биохимии, Москва, Россия

E-mail: aks1195@mail.ru

Введение. Глиобластома - наиболее агрессивная опухоль головного мозга. Одним из механизмов, позволяющих глиобластоме развивать резистентность к терапии, является альтернативный сплайсинг пре-мРНК [2], регулируемый фосфорилированием SRSF белков сплайсосомы. К основным киназам сплайсосомных белков относят белки семейств DYRK и Clk [3]. Нашими коллегами получен новый низкомолекулярный ингибитор этих ферментов - FG1059 [1]. Исследование действия указанного соединения на клетки глиобластомы стало целью данной работы.

Материалы и методы. Первичные культуры глиом получали из биоптатов пациентов. Пролиферацию и жизнеспособность клеток определяли с помощью реагента AlamarBlue. Уровень апоптоза определяли с помощью проточной цитофлуориметрии, окрашивая клетки набором CellEvent Caspase-3/7 Green. Первичную оценку эффекта FG1059 на сплайсинг РНК проводили с помощью RT-PCR и последующего электрофореза. Для полного анализа изменений сплайсинга было проведено секвенирование РНК клеток спустя 6 и 24 часа культивации с FG1059. Для исследования влияния FG1059 на локализацию SRSF клетки трансфецировали плазмидами, кодирующими флуоресцентно меченные белки SRSF1-4. Для изучения профиля фосфорилирования белков использовали фосфопротеомный анализ (LC-MS/MS с обогащением фосфопептидами на колонке с TiO₂) спустя 3, 6 и 12 часов после добавления FG1059.

Результаты. Показано, что FG1059 обладает значительно меньшей IC₅₀, чем у темозоламида и цисплатина, а также что FG1059 усиливает эффект пладиенолида Б и темозоламида. Транскриптомный анализ показал, что FG1059 вызывает выраженные изменения сплайсинга пре-мРНК, сопровождаемое перераспределением SRSF белков с ядерного на цитоплазматическое, что указывает на гипофосфорилирование этих белков. Фосфопротеомные данные продемонстрировали снижение фосфорилирования белков регуляторов сплайсинга через 3 часа инкубации с FG1059, а при более длительной инкубации снижается фосфорилирование белков сигнальных каскадов и регуляторов клеточного цикла.

Выводы. Ингибитор протеинкиназ Clk FG1059 нарушает сплайсинг РНК и вызывает гибель нейросфер глиобластомы значительно более эффективно, чем стандартные препараты цисплатин и темозоламид. Эти результаты указывают на потенциальную возможность использования ингибиторов Clk для терапии глиобластомы.

Источники и литература

- 1) Esvan Y.J., Zeinyeh W., Boibessot T., et al. Discovery of pyrido [3,4-g] quinazoline derivatives as CMGC family protein kinase inhibitors: Design, synthesis, inhibitory potency and X-ray co e crystal structure// Eur. J. Med. Chem. 2016. V. 118. - P. 170–177.
- 2) Pavlyukov M.S., Yu H., Bastola S., et al. Apoptotic Cell-Derived Extracellular Vesicles Promote Malignancy of Glioblastoma Via Intercellular Transfer of Splicing Factors// Cancer Cell. 2018. V. 34. No. 1. P. 119–135.

- 3) Zhihong Zhou and Xiang-Dong Fu. Regulation of splicing by SR proteins and SR protein-specific kinases// Chromosoma. 2013. V. 122. No. 3. P. 191–207.