

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт проблем химической физики Российской академии наук

*На правах рукописи*

**АКЕНТЬЕВА Наталья Павловна**

**RНАММ-ТАРГЕТ ПЕПТИДЫ: ИДЕНТИФИКАЦИЯ,  
ВЛИЯНИЕ НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ, АПОПТОЗ  
И ИНВАЗИВНОСТЬ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК**

1.5.4 – биохимия

Диссертация  
на соискание ученой степени  
доктора биологических наук

Научный консультант:  
**Топунов Алексей Федорович**  
доктор биологических наук, профессор

Черноголовка – 2021

## ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>ВВЕДЕНИЕ.....</b>	<b>6</b>
<b>Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....</b>	<b>15</b>
1.1. Роль пептидов в диагностике и терапии онкологических заболеваний .....	15
1.1.1. Опухоль-таргетные пептиды.....	22
1.1.2. Анти-микробные пептиды.....	28
1.1.3. Клеточно-проникающие пептиды.....	33
1.1.4. Клеточно-проникающие пептиды и доставка противоопухолевых препаратов.....	35
1.2. Общая характеристика системы RНАММ/ГК .....	39
1.2.1. Гиалуроновая кислота: структура, свойства и роль в онкогенезе .....	40
1.2.2. RНАММ, свойства, структура, область связывания с ГК и тубулином .....	46
1.3. ГК и RНАММ - мишени для терапии онкологических заболеваний .....	53
1.3.1. Таргетинг ГК.....	53
1.3.2. Таргетинг RНАММ для лечения раковых заболеваний .....	57
<b>Глава 2. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....</b>	<b>61</b>
2.1. Линии клеток .....	61
2.2. Синтез пептидов .....	61
2.3. Очистка пептидов.....	62
2.4. Получение и очистка рекомбинантного белка RНАММ-СТ.....	63
2.4.1. SDS-полиакриламидный гель электрофорез .....	63
2.4.2. Вестерн-блот анализ.....	64
2.4.3. Аланиновое сканирование.....	65
2.5. Анализ специфичности связывания пептидов с RНАММ-СТ .....	66
2.5.1. Определение связывания пептидов с RНАММ-СТ методом поверхностного плазмонного резонанса .....	66
2.5.2. Определение кинетических констант связывания пептидов с RНАММ-СТ методом поверхностного плазмонного резонанса .....	66
2.5.3. Анализ связывания FITC-пептидов с RНАММ-СТ .....	67
2.5.4. Анализ конкурентного замещения FITC-пептидами гиалуроновой кислоты на ГК-связывающем центре RНАММ-СТ .....	67
2.5.5. Мечение ГК с помощью Alexa Fluor 647 и Texas Red .....	68
2.5.6. Анализ конкурентного замещения ГК-Alexa Fluor 647 немечеными пептидами на ГК-связывающем центре RНАММ-СТ .....	68
2.5.7. Анализ связывания ГК-Texas Red с клетками РМЖ.....	68
2.5.8. Анализ связывания RНАММ с ГК.....	69
2.5.9. Анализ конкурентного замещения FITC-пептидами гликозаминогликанов на ГК-связывающем центре RНАММ-СТ .....	69
2.5.10. Анализ связывания пептидов с CD44 и RНАММ-СТ.....	70
2.6. Исследование стабильности пептидов в сыворотке .....	70
2.7. Анализ связывания пептидов с опухолевыми клетками .....	71
2.8. Анализ связывания FITC-пептидов с нокаут фибробластами RНАММ <sup>(-/-)</sup> и фибробластами, трансфицированными с RНАММ <sup>(+/+)</sup> .....	72
2.9. Оценка жизнеспособности клеток флуоресцентным методом.....	72
2.10. Анализ влияния пептидов на апоптоз и некроз клеток .....	73

2.11. Определение активности каспаз-3/7 колориметрическим методом .....	73
2.12. Мечение ГК флуоресцентным красителем (Cy5.5) .....	74
2.12.1. Связывание ГК-Cy5.5 с поверхностью клеток рака яичников.....	74
2.12.2. Анализ связывания FITC-VEGEGEEEGEEY пептида с поверхностью клеток рака яичников .....	75
2.13. Анализ центра связывания FITC-пептидов (GEGEEGEE и DFGEEAEE) с клетками РПЖ методом конфокальной микроскопии .....	76
2.14. Анализ влияния пептидов на инвазивность клеток с помощью метода деградации флуоресцентного желатина .....	76
2.15. Анализ влияния пептидов на пролиферацию клеток РМЖ и РПЖ с использованием бромдезоксисуридина (BrdU) .....	78
2.16. Анализ влияния пептидов на рост опухоли у ксенографтов (мышинная модель опухолевого роста).....	79
2.17. Статистическая обработка результатов .....	81
<b>Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....</b>	<b>82</b>
3.1. Идентификация, дизайн и синтез пептидов, специфично связывающихся с RНАММ .....	82
3.1.1. BLAST поиск и сравнительный анализ аминокислотных последовательностей белков .....	82
3.1.2. Синтез пептидов .....	86
3.1.3. Получение и очистка рекомбинантного белка RНАММ-СТ .....	86
3.2. Анализ специфичности связывания пептидов с RНАММ-СТ .....	91
3.2.1. Анализ связывания пептидов-лигандов с RНАММ-СТ с помощью поверхностного плазмонного резонанса.....	91
3.2.2. Анализ связывания FITC-пептидов с RНАММ-СТ .....	93
3.2.3. Сравнительный анализ аминокислотной последовательности пептидов.....	93
3.2.4. Идентификация в составе пептидов аминокислот, необходимых для связывания с RНАММ-СТ.....	97
3.2.5. Анализ конкурентного связывания FITC-пептидов на ГК-связывающем центре RНАММ-СТ .....	98
3.2.6. Анализ связывания гликозаминогликанов на ГК-связывающем центре RНАММ-СТ .....	100
3.2.7. Анализ связывания пептидов с CD44 и RНАММ-СТ.....	100
3.2.8. Анализ стабильности пептидов.....	102
3.2.9. Анализ связывания RНАММ с ГК.....	104
3.2.10. Исследование связывания ГК-Texas Red и FITC-пептидов с клетками.....	104
3.2.11. Связывание ГК-Texas Red с поверхностью клеток РМЖ .....	105
3.2.12. Связывание FITC-пептидов с поверхностью клеток рака молочной железы	106
3.2.13. Связывание FITC-пептидов с поверхностью клеток рака предстательной железы .....	108
3.2.14. Исследование связывания RНАММ-таргет пептидов с фибробластами RНАММ <sup>(-/-)</sup> и фибробластами, трансфицированными с RНАММ <sup>(+/+)</sup> .....	110
3.3. Исследование влияния RНАММ-таргет пептидов на выживаемость опухолевых клеток .....	111
3.3.1. Влияние RНАММ-таргет пептидов на выживаемость и пролиферацию клеток рака молочной железы .....	112
3.3.2. Исследование влияния RНАММ-таргет пептидов на апоптоз и некроз опухолевых клеток молочной железы.....	113

3.3.3. Влияние RНАММ-таргет пептидов на активность каспаз-3/7.....	117
3.4. Влияние RНАММ-таргет пептидов на инвазивность клеток рака молочной железы .....	118
3.4.1. Анализ инвазивности опухолевых клеток MDA-MB-231 во времени.....	118
3.4.2. Эффект RНАММ-таргет пептидов на инвазивность клеток рака молочной железы .....	120
3.4.3. Анализ гетерогенности популяции MDA-MB-231 клеток в процессе развития инвазивности.....	122
3.4.4. Морфологические изменения актина в клетках РМЖ при обработке RНАММ-таргет пептидами.....	124
3.5. Исследование влияния RНАММ-таргет пептидов на жизнеспособность и пролиферацию клеток рака предстательной железы.....	127
3.5.1. Влияние RНАММ-таргет пептидов на апоптоз и некроз клеток рака предстательной железы.....	129
3.5.2. Влияние RНАММ-таргет пептидов на активность каспаз-3/7 в клетках рака предстательной железы.....	130
3.6. Ингибирование инвазивности клеток рака предстательной железы под действием пептидов (GEGEEGEE и DFGEEAEE).....	131
3.6.1. Изучение связывания пептидов (FITC- GEGEEGEE и FITC-DFGEEAEE) с клетками рака предстательной железы .....	131
3.6.2. Сравнительный анализ инвазивности клеток рака предстательной железы, мышинных эмбриональных фибробластов и клеток меланомы кожи.....	135
3.6.3. Эффект RНАММ-таргет пептидов на инвазивность клеток РПЖ .....	136
3.7. Визуализация клеток рака яичников с помощью пептида VEGEGEEEGEEY	138
3.7.1. Связывание ГК-Су5.5 с поверхностью клеток рака яичников.....	139
3.7.2. Связывание VEGEGEEEGEEY пептида с RНАММ на поверхности клеток рака яичников.....	140
3.8. Исследование влияния пептида RYQLHPYR на жизнеспособность клеток рака предстательной железы .....	143
3.8.1. Влияние пептида RYQLHPYR на апоптоз и некроз клеток рака предстательной железы .....	144
3.8.2. Влияние пептида RYQLHPYR на активность каспаз-3/7.....	146
3.8.3. Влияние пептида RYQLHPYR на инвазивность клеток РПЖ.....	146
3.9. Влияние RНАММ-таргет пептидов на рост опухоли у ксенографтов (мышинная опухолевая модель) .....	149

## **Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ .....**

4.1. Идентификация, дизайн и синтез RНАММ-таргет пептидов.....	152
4.2. Влияние RНАММ-таргет пептидов на выживаемость и пролиферацию опухолевых клеток.....	154
4.3. Влияние RНАММ-таргет пептидов на апоптоз и некроз опухолевых клеток	155
4.4. Влияние RНАММ-таргет пептидов на инвазивность опухолевых клеток.....	157
4.4.1. Ингибирование инвазивности опухолевых клеток молочной железы под действием RНАММ-таргет пептидов.....	159
4.4.2. Анализ гетерогенности популяции MDA-MB-231 клеток в процессе инвазивности.....	160
4.4.3. Морфологические изменения актина в клетках РМЖ при обработке RНАММ-таргет пептидами.....	161
4.4.4. Влияние RНАММ-таргет пептидов на инвазивность клеток РПЖ.....	162

4.5. Противоопухолевая активность RНАММ-таргет пептидов на моделях ксенографтов (мышинная опухолевая модель) .....	163
4.6. Визуализация клеток рака яичников пептидом VEGEGEEEGEEY .....	164
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....</b>	<b>169</b>
<b>ВЫВОДЫ .....</b>	<b>171</b>
<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ .....</b>	<b>174</b>
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....</b>	<b>176</b>

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность темы исследования

Частота возникновения онкологических заболеваний в мире растет в геометрической прогрессии. Согласно статистике уровень смертности от онкологических заболеваний также стремительно растет и составит 40% от общего количества смертельных случаев к 2025 году [1, 167]. Кроме того, лечение онкологических заболеваний является крайне дорогостоящим. Несмотря на определенные успехи в лечении онкологических заболеваний, основной проблемой в онкологии является отсутствие селективности противоопухолевых препаратов. Поэтому разработка новых способов для таргетной терапии раковых заболеваний [15] является самой актуальной и активно развивающейся областью биомедицины.

Таргетная, адресная химиотерапия позволяет избирательно и эффективно локализовать препарат на молекулярных мишенях в клетке (в частности, на рецепторах), в то же время ограничить его доступ к нормальной клетке и, таким образом, получить максимальный терапевтический эффект и снизить токсичность препарата. На протяжении последних лет использование пептидов как перспективных диагностических и терапевтических агентов для лечения онкологических заболеваний стремительно растет. Терапевтические пептиды завоевывают все большую популярность для применения в медицине в различных аспектах, в том числе, в виде противоопухолевых вакцин, антимикробной терапии, для доставки нуклеиновых кислот, для ранней диагностики и терапии онкологических заболеваний [1, 128, 208, 258, 288, 322, 384, 399, 602]. Недавно установлено, что антимикробный пептид низин обладает противоопухолевой активностью, низин индуцирует апоптоз и подавляет пролиферацию клеток астероцитомы (SW1088) человека [1, 624]. В ходе исследований было выявлено, что пептиды имеют разную физиологическую активность и различный эффект действия [1] на опухолевые клетки. Многие природные и синтетические «проапоптотические» [1] пептиды индуцируют ферменты апоптоза и вызывают гибель клеток. Например, катионный антимикробный пептид, выделенный из бразильского тарантула, обладает не только бактериостатическими свойствами, но также проявляет противоопухолевую активность *in vitro* и *in vivo* [1, 523]. Так называемые «клеточно-проникающие пептиды» усиливают эффект химиотерапевтических препаратов, в то же время «мембранно-литические», катионные антимикробные пептиды разрушают мембраны раковых клеток [1, 15, 78, 301, 304, 324, 565]. Недавно показано, что пептиды, выделенные из австралийской лягушки, ингибируют деление клеток рака молочной железы [1, 622]. Химерные пептиды проявляют противоопухолевую активность и понижают множественную лекарственную устойчивость опухолей [1, 551]. Известно, что клеточно-проникающий пептид dNP2 может ускорять накопление противоопухолевых препаратов в клетке и тем самым повышать эффективность лечения рака [603].

Известно, что под воздействием различных неблагоприятных факторов нормальная клетка может переродиться в раковую клетку, которая характеризуется повышенным уровнем экспрессии рецепторов, белков или ферментов, являющихся молекулярными мишенями опухолевой клетки. Существует категория противоопухолевых пептидов (пептиды-антагонисты), которые преимущественно связываются с известным рецептором и модулируют его активность, активируют или блокируют его функции, и тем самым влияют на процессы развития и прогрессии рака [1, 64, 271, 425, 435, 527, 571, 632]. В качестве примера можно привести белок 2 (Grb2), связанный с рецептором фактора роста. Этот белок 2 (Grb2) является белок [1]-адаптером, который в значительной степени вовлечен в опухолевые новообразования, и блокирование этого белка пептидами приводит к подавлению роста опухоли [1, 227]. В последнее время эфрин-рецепторы киназной системы также привлекают все большее внимание как основной класс потенциальных мишеней для лекарств [1, 305]. Были идентифицированы пептиды, которые специфично связываются с эфрин-рецепторами с высоким сродством [1, 280]. Эти пептиды, как правило, являются антагонистами, которые ингибируют связывание эфрина и передачу сигналов на эфрин-рецептор, но некоторые являются агонистами, имитирующими активацию эфрин-рецептора [1, 577]. Помимо модуляции функции эфрин-рецептора такие пептиды могут служить в качестве диагностических и терапевтических средств, а также для доставки различных наночастиц в опухоли и другие пораженные ткани, представляющие мишени эфрин-рецепторов [1, 11, 414]. Такие пептиды-антагонисты имеют большие перспективы, потому что их действие нацелено на конкретную молекулярную мишень опухолевых клеток, что приводит к их гибели [15].

RHAMM/HMMR онкорептор (рецептор гиалуронан опосредованной подвижности) является такой молекулярной мишенью для диагностических, прогностических и терапевтических целей в области лечения онкологических заболеваний [1]. В настоящее время установлено, что RHAMM рецептор синтезируется в избытке в метастатических, агрессивных опухолевых клетках по сравнению с нормальными клетками. В ряде работ было показано, что повышенное содержание RHAMM рецептора наблюдается в клетках рака молочной и предстательной желез, толстой кишки, в солидных опухолях и в клетках рака крови, при миелоидном лейкозе, множественной миеломе, и, обычно, повышенный синтез RHAMM рецептора коррелирует с плохим прогнозом [1, 95, 515, 543]. Поэтому идентификация пептидов, специфично связывающихся с RHAMM рецептором и блокирующих его сигнальные пути, является одним из перспективных подходов для диагностики и лечения злокачественных новообразований [1].

Диссертационная работа посвящена идентификации и синтезу пептидов-антагонистов, способных специфично связываться с RHAMM онкорептором на поверхности опухолевых клеток, модулировать активность RHAMM рецептора, блокировать передачу сигналов от ги-

лурановой кислоты (ГК) к RНАММ рецептору и тем самым подавлять пролиферацию, жизнеспособность раковых клеток на самой ранней стадии.

RНАММ-таргет пептиды, способные блокировать центр связывания ГК на RНАММ рецепторе, представляют собой новую стратегию в противоопухолевой терапии, направленную на индукцию процессов апоптоза, некроза, ингибирование жизнеспособности и инвазивности опухолевых клеток [1]. До данного научного исследования в литературе отсутствовали работы по изучению диагностического и терапевтического потенциала RНАММ-таргет пептидов, поэтому проведение фундаментальных исследований в этом направлении имеет научно-практическое значение.

Актуальность диссертационной работы определяется тем, что она направлена на поиск и идентификацию пептидов, способных специфично связываться с RНАММ рецептором опухолевых клеток, целенаправленно воздействовать на раковые клетки и регулировать ключевые клеточные процессы, такие как пролиферация, жизнеспособность, апоптоз, некроз, инвазивность и метастазирование раковых клеток.

**Цель исследования:** идентификация, дизайн RНАММ-таргет пептидов и исследование их потенциала для диагностики и адресной терапии злокачественных новообразований.

Для реализации этой цели были поставлены следующие **задачи:**

*1. Идентифицировать и синтезировать пептиды, специфично связывающиеся с RНАММ рецептором;*

1.1. Исследовать специфичность взаимодействия пептидов с рекомбинантным RНАММ-СТ;

1.2. Исследовать специфичность связывания RНАММ-таргет пептидов с RНАММ рецептором раковых клеток молочной, предстательной желез и с клетками рака яичников.

*2. Изучить влияние RНАММ-таргет пептидов на жизнеспособность, апоптоз, некроз, активность каспаз-3/7, инвазивность опухолевых клеток молочной железы.*

*3. Исследовать влияние RНАММ-таргет пептидов на жизнеспособность, апоптоз, некроз, активность каспаз-3/7, инвазивность опухолевых клеток предстательной железы.*

*4. Исследовать противоопухолевую активность RНАММ-таргет пептидов с помощью ксенографтов (животная опухолевая модель).*

*5. Исследовать диагностический потенциал RНАММ-таргет пептидов для визуализации рака яичников;*

5.1. Исследовать связывание ГК-Су5.5 с поверхностью клеток рака яичников;

5.2. Исследовать специфичность связывания FITC-VEGEGEEGEEY-пептида с RНАММ на поверхности клеток рака яичников.

**Научная новизна**

В результате проведенного исследования получены новые и научно-значимые результаты, представляющие интерес для молекулярной диагностики и клеточной терапии онкологических заболеваний. Предложена научная концепция использования RНАММ-таргет пептидов для модуляции активности RНАММ-рецептора и применения RНАММ-таргет пептидов в качестве тераностиков злокачественных новообразований различной локализации.

Представлена оригинальная нетрадиционная система дизайна пептидов-миметиков гиалуроновой кислоты из аминокислотных последовательностей  $\alpha$ - и  $\beta$ -тубулина. Впервые идентифицированы и синтезированы пептиды, представляющие собой фрагменты белка тубулина, специфично связывающиеся с RНАММ рецептором. Введен новый термин RНАММ-таргет пептиды. Разработана новая, эффективная экспериментальная методика получения и выделения рекомбинантного RНАММ-СТ белка методом генной инженерии, позволяющая получить гомогенный белок с высоким выходом, обладающий биологической активностью.

Разработаны новые методики для изучения специфичности связывания RНАММ-таргет пептидов с рекомбинантным RНАММ-СТ.

Предложен новый комплексный, биоинформационный подход для сравнительного анализа аминокислотных последовательностей белков, пептидов с целью поиска гомологичных структур. Впервые выявлена закономерность между наличием общего фрагмента EEXEEZ в структуре RНАММ-таргет пептидах с их специфичностью и высоким сродством связывания с RНАММ-СТ.

Впервые показано, что пептиды специфично связываются с RНАММ рецептором на поверхности опухолевых клеток рака молочной, предстательной желез и рака яичников [15]. Впервые показано, что RНАММ-таргет пептиды могут использоваться для адресной визуализации опухолевых клеток. Впервые показано, что RНАММ-таргет пептиды имеют потенциал для ранней молекулярной диагностики злокачественных новообразований.

Разработана новая научная система использования RНАММ-таргет пептидов, специфичных блокаторов ГК/RНАММ сигнального пути, для клеточной терапии раковых заболеваний с помощью индукции процессов апоптоза, некроза, подавления жизнеспособности, пролиферации и инвазивности опухолевых клеток.

Впервые продемонстрирована высокая специфичная цитотоксическая и противоопухолевая активность RНАММ-таргет пептидов *in vitro* и *in vivo*.

Впервые показано, что RНАММ-таргет пептиды обладают апоптотическим потенциалом, индуцируют апоптоз и некроз опухолевых клеток молочной и предстательной желез. Впервые показано, что RНАММ-таргет пептиды повышают активность каспаз-3/7 в опухолевых клетках молочной и предстательной желез и тем самым индуцируют апоптоз по митохондриальному пути.

Впервые соискателем исследована связь между структурой, размером RНАММ-таргет пептидов и их физиологической активностью в клетках. Доказана закономерность соответствия структуры и функции RНАММ-таргет пептидов.

Впервые показано, что RНАММ-таргет пептиды вызывают морфологические изменения в клетках, нарушают структурную организацию актина и подавляют образование инвадоподий опухолевых клеток молочной и предстательной желез. Впервые методом флуоресцентной конфокальной микроскопии показано, что популяции клеток РМЖ является гетерогенной и состоит из мелких злокачественных, инвазивных клеток и многоядерных неинвазивных клеток старения (senescence cells). Впервые показано, что RНАММ-таргет пептиды уменьшают количество клеток старения и, следовательно, обладают сенолитическим потенциалом.

Впервые показано, RНАММ-таргет пептиды обладают антиметастатическим потенциалом, так как ингибируют инвазивность клеток рака молочной и предстательной желез.

Впервые установлено, что RНАММ-таргет пептиды проявляют противоопухолевую активность *in vivo* (ксенографты, мышинная опухолевая модель).

Впервые исследован диагностический и терапевтический потенциал RНАММ-таргет пептидов.

#### **Методология и методы диссертационного исследования**

В диссертационной работе были использованы линии культур клеток и иммунодефицитные мыши. Для реализации поставленных задач были использованы следующие методы исследования: химические (синтез и очистка пептидов, твердофазный химический синтез); физико-химические (масс-спектрометрия, флуориметрия, конфокальная микроскопия, центрифугирование, SDS-полиакриламидный гель электрофорез, Вестерн-блот анализ, хроматография, SPR (поверхностный плазмонный резонанс), флуоресцентное мечение); биохимические (выделение и очистка рекомбинантного белка, исследование биологической активности пептидов на культурах клеток, оценка жизнеспособности клеток флуоресцентным методом (AlamarBlue), анализ апоптоза и некроза клеток с помощью ELISA метода, исследование активности каспаз 3/7 колориметрическим методом в клетках, анализ инвазивности клеток с помощью метода деградации флуоресцентного желатина, изучение противоопухолевой активности пептидов на животных моделях (перевиваемые опухоли, мышинные ксенографты).

#### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Теоретическая значимость исследования основана на том, что впервые получены новые фундаментальные знания о взаимодействии RНАММ-таргет пептидов с RНАММ рецептором. В результате проведенного исследования создана научная концепция о модуляции активности RНАММ онкорепцтора с помощью пептидов. В работе изложены доказательства о ключевой роли RНАММ рецептора в регуляции важных клеточных процессов, таких как жизнеспособ-

ность, пролиферация, апоптоз, некроз и инвазивность опухолевых клеток. Эти данные расширяют фундаментальные знания в области биохимии о физиологической активности пептидов, механизме их действия, регуляции сигнальных путей с помощью пептидов, природных регуляторов клеточного метаболизма. В работе изложены доказательства о взаимосвязи между структурой пептидов и их способностью связываться с RНАММ рецептором, доказана роль ключевых аминокислот в пептид-белковых взаимодействиях.

Диссертационная работа имеет фундаментальное значение с перспективой практического применения в биомедицине и в онкологии. Впервые разработана система биоинформационных методов исследования, компьютерных программ для количественного анализа результатов, использованы современные экспериментальные методики, позволившие получить важные результаты. Впервые продемонстрирована гомология между аминокислотной последовательностью ГК-связывающего центра на RНАММ рецепторе и аминокислотной последовательностью тубулин-связывающей области кинезинов, микро-трубочек ассоциированных белков. Эти результаты расширяют возможности для разработки новых таргетных пептидов на основе изучения белок-белковых взаимодействий. Методами компьютерного анализа выявлена гомология в аминокислотной последовательности RНАММ-таргет пептидов, доказывающая наличие связей между структурой и функцией пептидов.

Впервые разработан эффективный метод получения рекомбинантного RНАММ-СТ белка с помощью генной-инженерии, позволяющий получить гомогенный белок с высоким выходом. Метод выделения и очистки RНАММ-СТ белка для лечения диабета 2-го типа запатентован (международный патент на изобретение № 12459, Naor et. al., 2013). Новые методы идентификации RНАММ-таргет пептидов и анализа их специфичности связывания с RНАММ рецептором являются универсальными и могут быть использованы для исследований других рецепторов и их пептидов-лигандов.

Полученные результаты являются научно-значимыми, так как впервые изучен диагностический и терапевтический потенциал RНАММ-таргет пептидов для лечения онкологических заболеваний. Визуализация опухолевых клеток с помощью флуоресцентно-меченых RНАММ-таргет пептидов позволит создавать молекулярные зонды для ранней неинвазивной диагностики злокачественных новообразований. Впервые показано, что RНАММ-таргет пептиды обладают цитотоксической, апоптотической, сенолитической и анти-метастатической активностью. Эти результаты служат основанием для разработки нового подхода-таргетной терапии в лечении онкологических заболеваний, с применением RНАММ-таргет пептидов, специфичных блокаторов ГК/RНАММ сигнального пути. Эти данные являются важными, так как RНАММ-таргет пептиды могут использоваться в трансляционной онкологии, в частности, в

молекулярной диагностике и клеточной терапии злокачественных новообразований различной локализации.

В результате проведенного исследования представлены рекомендации практического применения RНАММ-таргет пептидов для клеточной терапии рака: индукция апоптоза, некроза, подавление роста и инвазивности опухолевых клеток *in vitro* и *in vivo*. Перспектива практического использования RНАММ-таргет пептидов основана на их дешевом синтезе и специфичности действия. Полученные результаты могут быть использованы в дальнейшем для проведения доклинических испытаний.

Материалы и методы, представленные в диссертационной работе, внедрены в научно-исследовательскую работу и образовательный процесс студентов, аспирантов Отдела кинетики химических и биологических процессов Института проблем химической физики РАН.

#### **Положения, выносимые на защиту**

1. Синтезированные пептиды являются препаратами направленного действия, специфично связываются с RНАММ рецептором и модулируют его активность.

2. RНАММ-таргет пептиды обладают:

- цитостатическим эффектом, понижают жизнеспособность, индуцируют апоптоз, некроз опухолевых клеток, повышают активность каспаз-3/7;

- антиметастатической активностью, ингибируют инвазивность опухолевых клеток молочной и предстательной желез;

- противоопухолевой активностью *in vivo* (ксенографты, мышьяная опухолевая модель).

3. RНАММ-таргет пептиды обладают диагностическим потенциалом для визуализации раковых клеток.

#### **Личный вклад соискателя**

Личный вклад соискателя состоит в том, что он принимал непосредственное участие в получении исходных данных, лично участвовал в дизайне и проведении экспериментов на всех этапах исследования. Все результаты, представленные соискателем в диссертации, получены им лично или под его непосредственным руководством, а также в сотрудничестве с коллегами из Лондонского научного центра (г. Лондон, Онтарио, Канада), профессорами Е. Тюрли, Л. Лют и научным сотрудником К. Эсгуэрра (синтез пептидов); и профессором А. Эверс из Вашингтонского университета в г. Сент-Луис (г. Сент-Луис, Миссури, США).

Автором предложена научная концепция и план исследования по идентификации RНАММ-таргет пептидов и изучению их диагностического и терапевтического потенциала для лечения онкологических заболеваний. Автор изучил современную научную литературу по проблеме исследования и на основе предложенного плана получил основную часть результатов. Автор использовал уникальные методики для проведения ключевых экспериментов: биоин-

формационные подходы, компьютерные программы, масс-спектрометрический метод для идентификации пептидов; разработал метод для получения и очистки рекомбинантного RНАММ-СТ белка, методики анализа конкурентного связывания пептидов с RНАММ-СТ, анализ специфичности связывания флуоресцентно-меченых пептидов с поверхностью опухолевых клеток; адаптировал методики по влиянию пептидов на жизнеспособность, пролиферацию, апоптоз, некроз, инвазивность опухолевых клеток. Автор лично разрабатывал дизайн экспериментов, составлял протоколы экспериментов, лично проводил эксперименты, описанные в диссертации, освоил и использовал современные методы, такие как метод флуоресцентной конфокальной микроскопии, SPR, Elisa метод, Western-blot, масс-спектрометрический анализ пептидов, метод имплантации раковых клеток в ксенографты (модель опухолевого роста) и другие. Автор лично проводил статистическую обработку данных, анализировал и интерпретировал полученные результаты. Автор лично готовил публикации по выполненной работе, либо принимал участие в их написании, публиковал основные результаты в высокорейтинговых, рецензируемых научных журналах. Автореферат и диссертационная работа написаны лично автором.

Автор лично участвовал в апробации результатов исследования на симпозиумах, представлял стендовые доклады и выступал с устными докладами на международных и российских конференциях.

#### **Степень достоверности и апробация результатов**

Достоверность результатов исследования основана на том, что диссертационная работа выполнена на высоком теоретическом и экспериментальном уровне с применением современного сертифицированного оборудования, новых методов исследования, с использованием разнообразных объектов. С помощью уникального метода масс-спектрометрического анализа идентифицированы уникальные RНАММ-таргет пептиды, представляющие собой фрагменты аминокислотной последовательности белка тубулина. Идея модуляции активности RНАММ рецептора под действием пептидов базируется на обобщении литературных данных. В ходе исследования проведен тщательный анализ связывания пептидов с RНАММ рецептором, показана воспроизводимость результатов с различными клеточными линиями. Методом геной инженерии был получен рекомбинантный RНАММ-СТ для изучения специфичности связывания пептидов с RНАММ рецептором, что позволило провести исследования на качественном уровне. В работе использованы клеточные модели для проведения исследований *in vitro*, различные культуры клеток, в которых наблюдается повышенная экспрессия RНАММ рецептора. Противоопухолевая активность RНАММ-таргет пептидов убедительно продемонстрирована *in vitro* и *in vivo*. В работе использовано сравнение авторских данных и данных, полученных ранее по рассматриваемой тематике. Эксперименты включают достаточное количество технических повторений и адекватное количество контрольных измерений. В соответствии с поставленными задачами в работе применялись

современные подходы, модели, методики сбора и анализа исходной информации [16]. Все экспериментальные результаты, полученные *in vitro* и *in vivo*, представлены как средние от трех повторных экспериментов. Достоверность полученных результатов базируется на количественном статистическом анализе данных [16], который проводился с использованием программ GraphPad Prizm, One-Way ANOVA. Статистически значимые различия между группами определяли с помощью Turkey-теста. Анализ, оценка и обсуждение полученных результатов соответствуют поставленным задачам. Результаты работы полностью согласуются с опубликованными литературными данными по теме диссертации.

Основные результаты исследований были представлены и доложены на всероссийских и международных конференциях: Annual Research Day, July 15<sup>th</sup>, 2010, London, Canada; Cancer Care Ontario Research Day, April 8<sup>th</sup>, 2010, Toronto, Canada; Workshop “Imaging Applications in Prostate cancer”, November 19<sup>th</sup>, 2010, London, Canada; 50<sup>th</sup> Annual Meeting ASCB, December 11–15<sup>th</sup>, 2010, Philadelphia, PA, USA; 2010 ASCB Annual Meeting, Pittsburg, PA, USA; Research & Education Day–2011 University of Western Ontario, June 17<sup>th</sup>, 2011, London, ON, Canada; 94<sup>th</sup> Canadian Chemistry Conference, Montreal, QC, June 2011; London Health Research Day, March 20<sup>th</sup>, 2012, London, Canada; Oncology day, London, May 2012, Canada; Oncology Research and Education Day, June 2012, London, Canada; Oncology Research and Education Day, 2013, London, ON, Canada. Международный междисциплинарный Форум «Moscow Science Week», 8–12 сентября, 2014, Москва, Россия; XII Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Отечественные противоопухолевые препараты», 30 марта – 1 апреля, 2015, Москва, Россия; XIII Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Отечественные противоопухолевые препараты» памяти А. Ю. Барышникова, 17–18 марта, 2016, Москва, Россия; IV Всероссийская Конференция по молекулярной онкологии, 17–19 декабря 2018, Москва, Россия.

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 30 печатных работ, из них 15 статей в высокорейтинговых международных и отечественных изданиях, цитируемых в Web of Science Core Collection, Scopus и рекомендованных ВАК РФ, 1 международный патент и 13 публикаций в докладах российских и международных научных конференций. По результатам исследования опубликованы статьи в отечественных и международных журналах, таких как: *Biomacromolecules* (2012), *Electrophoresis* (2012), *Cancer* (2014), *Integrative Biology* (Camb., 2015), *American Journal of Pathology* (2012), Бюллетень экспериментальной биологии и медицины (2015), Вопросы онкологии (2016), Биохимия (2017, 2018), *EuroBiotechnology J.* (2017), Российский Биотерапевтический Журнал (2019), *Chinese Clinical Surgery* (2020), *Biointerface Research in Applied Chemistry* (2021), International Patent № 12459 (2013, United States Provisional Patent Application No. 62/560,790; Ref: 2513453 SL/nb).

**Структура и объем диссертации.** Диссертация построена по традиционной схеме и содержит разделы «Введение», «Обзор литературы», «Методы исследования», «Результаты исследования», «Обсуждение результатов», «Заключение», «Выводы», «Список сокращений», «Список литературы», включающий 639 источников. Работа изложена на 209 страницах компьютерного текста, содержит 10 таблиц и 74 рисунка.

## **Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ**

### **1.1. Роль пептидов в диагностике и терапии онкологических заболеваний**

Онкологические заболевания занимают второе место по смертности в мире после сердечно-сосудистых заболеваний. Злокачественные новообразования все еще являются серьезной проблемой для научного и медицинского сообщества.

Рак – это не отдельное заболевание, а группа заболеваний, характеризующихся нерегулируемым ростом аномальных клеток. Движущей силой этого неконтролируемого роста является ряд мутаций, которые вызывают aberrантную экспрессию генных продуктов, необходимых для регуляции пролиферации, выживания и роста клеток. Следовательно, рак возникает из-за дефектов самых основных биологических функций клеток: способности реагировать на сигналы роста, задействовать программы гибели клеток для устранения ненужных, избыточных или поврежденных клеток, а также образование новых кровеносных сосудов и способности проникать в ткани. Задача, стоящая перед клиницистами и исследователями, которые ищут эффективные терапевтические подходы для лечения онкологических заболеваний, заключается в устранении раковых клеток при сохранении нормальной, здоровой ткани.

В настоящее время частота возникновения рака предстательной железы у мужчин находится на втором месте после рака желудка и легких. В Российской Федерации наблюдается высокий уровень заболеваемости раком предстательной железы (более 5%), особенно у мужчин после 60 лет. Рак предстательной железы зачастую диагностируется уже на последних стадиях (3-й или 4-й), когда образуются метастазы [7].

Рак молочной железы – это наиболее частая форма рака среди женщин в России и в мире, с показателями заболеваемости 99,4 на 100 000 женщин в возрасте от 13 до 90 лет [4]. Рак яичников считается одним из наиболее агрессивных видов злокачественных опухолей у женщин. Ежегодно в мире диагностируется более 225 тысяч новых случаев рака яичников, из которых около половины заканчивается смертельным исходом [8]. Основная проблема – это диагностика рака яичников на поздней стадии (около 75% случаев обнаруживается уже при появлении метастазов). Поэтому актуальность разработки таргетных противоопухолевых препаратов определяется высокой частотой онкологических заболеваний во всем мире, поздней диагностикой, от-

сутствием неинвазивных методов диагностики, низкой выживаемостью онкологических больных и дорогостоящим лечением раковых заболеваний.

Хотя в последние годы был достигнут значительный прогресс в лечении онкологических заболеваний, большинство современных методов лечения рака включают хирургическое вмешательство или химио-, радиационную и гормональную терапию, которые мало изменились за последнее десятилетие и имеют ряд ограничений. Так хирургическое вмешательство и радиотерапия применяются часто уже на последних стадиях развития рака, эти методы не являются специфичными, они не подавляют образование метастазов. Химиотерапевтические методы также имеют ряд недостатков. Используемые в настоящее время химиотерапевтические препараты основаны на быстром делении опухолевых клеток и не учитывают другие специфические свойства раковых клеток. Например, обычные химиотерапевтические препараты (то есть, ДНК-алкилирующие агенты), которые нацелены на пролиферирующие раковые клетки, также повреждают здоровые растущие клетки, но могут не устранить элиминационные или непролиферирующие раковые клетки [246, 380]. Кроме того, зачастую при химиотерапии наблюдается развитие лекарственной устойчивости опухоли, которое может быть связано с нарушениями в доставке лекарств или детоксифицирующими ферментами, которые влияют на взаимодействие между лекарством и его мишенью. Дефекты в механизмах репарации ДНК и путей апоптоза или гибели клеток также могут приводить к развитию устойчивости к противоопухолевым лекарственным средствам. Даже если первоначальные методы лечения были успешны, риск рецидива рака остается проблемой для пациентов. Кроме того многие противоопухолевые препараты обладают высокой токсичностью, проявляют побочные эффекты, отличаются плохой растворимостью, слабой проницаемостью в клетку и плохой биосовместимостью. Стремление найти новые лекарства от рака стимулировало исследования по эволюции малых молекул как лекарств, но проблемы с непредвиденными нецелевыми последствиями создали потребность в альтернативных подходах. В связи с этим появился новый класс противоопухолевых реагентов, который основан на пептидах. Эти молекулы с малой молекулярной массой могут быть смоделированы из эндогенных белков, синтез пептидов является дешевым и экономически эффективным, они легко поддаются модификации. Пептиды находят применение, как в диагностике, так и в лечении рака, обеспечивая специфичность для опухолевых тканей, снижают вероятность развития лекарственной устойчивости и имеют низкую токсичность.

Каждая опухоль обладает своими специфичными признаками (иногда специфичными и для пациента, так называемыми молекулярными подписями-signature), которые экспрессируются в опухоли в больших количествах и/или располагаются в другом месте по сравнению с нормальной тканью. Эта опухоль-специфичная подпись дает возможность развивать адресные, таргетные агенты для раннего выявления, диагностики и терапии онкологических заболеваний. Синтетиче-

ские полипептиды являются отличными кандидатами для диагностики раковых заболеваний. В частности, пептиды-лиганды имеют преимущества из-за их небольшого размера, легкого и доступного производства, высокой специфичности и замечательной гибкости в отношении их последовательности и возможностей конъюгации. В сочетании с визуализирующими агентами, химиотерапевтическими препаратами /или наноносителями, они хорошо себя зарекомендовали для таргетной доставки, обеспечивая лучшее контурирование опухолевой массы при визуализации и повышая эффективность химиотерапии, за счет снижения побочных эффектов. В новую эру персонализированной/точной медицины целью терапевтического лечения является применение опухоле- и пациент-специфичных генетических и молекулярных особенностей для выбора специфичной направленной терапии для каждого пациента [140, 420, 446]. Последнее десятилетие ознаменовалось появлением многочисленных целенаправленных реагентов, обеспечивающих таргетную доставку противоопухолевых препаратов. Например, были разработаны антитела, направленные на рак, которые показали отличные характеристики в качестве транспортных средств, для доставки радионуклидов с целью визуализации рака, а также для доставки цитотоксических средств для химиотерапии. Однако, несмотря на то, что они были одобрены FDA и прошли клинические испытания, они имели ряд ограничений. Например, некоторая область антител (fragment crystallizable) имела тенденцию не специфически связываться с ретикулоэндотелиальной системой, вызывая заметную токсичность в отношении таких тканей, как печень, селезенка и костный мозг [192, 293, 453]. Кроме того, вследствие их высокой молекулярной массы (до 160 кДа), они плохо диффундировали в опухоли или вообще не достигали мозга в случае опухолей центральной нервной системы [256, 257]. Кроме того, несмотря на то, что терапевтические антитела являются очень специфичными и эффективными, их производство является довольно трудоемким и весьма дорогостоящим. В свете этих недостатков, таргетные пептиды можно рассматривать как альтернативное средство для доставки диагностических агентов и/или противоопухолевых препаратов. По сравнению с антителами, таргетные пептиды имеют ряд преимуществ. В частности, они не являются иммуногенными, быстро выводятся из крови, лучше диффундируют внутрь опухоли из-за их более низкой молекулярной массы, и исключительно хорошо переносятся пациентами. Следует отметить, что короткий период полураспада пептидов, который может уменьшить их накопление в опухоли, часто считается одним из их ограничений. Однако более длительный период полураспада пептидов может быть получен путем предотвращения их деградации в крови протеазами несколькими способами, а именно, через наличие цикла, образованного, например, дисульфидными связями между двумя цистеинами; блокированием С- и N-концов; заменой эукариотических аминокислот их D-аналогами или использованием неприродных аминокислот, несовместимых с эндогенными протеазами. Кроме того, длительный период полураспада в случае квантовых дотов, покрытых пептидами, достигается за счет ПЭГ,

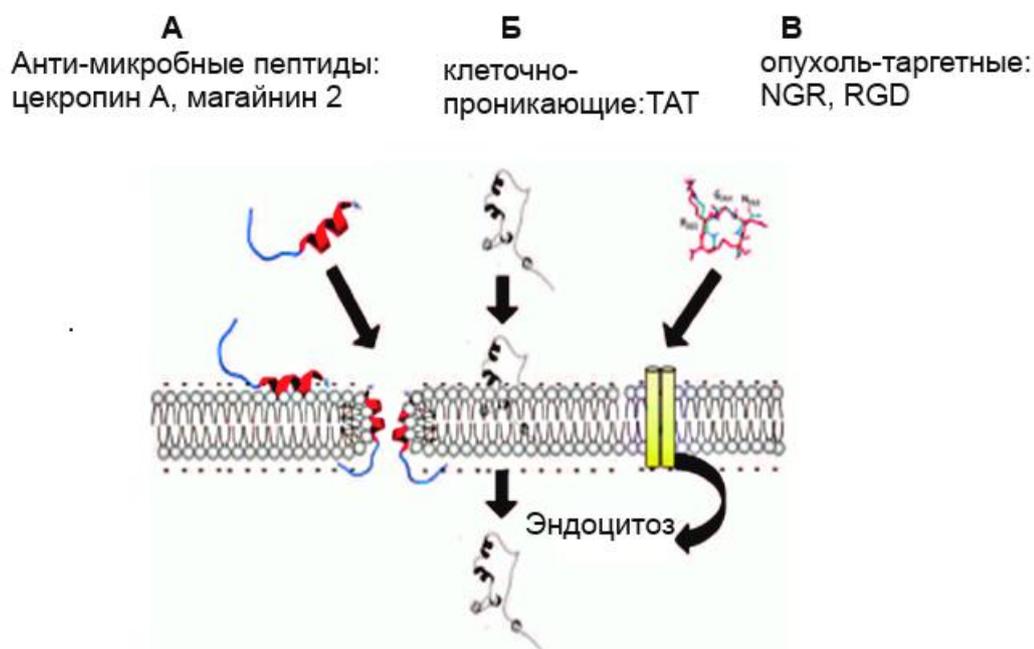
который исключает на 95% неспецифическое поглощение печенью и селезенкой [21]. Кроме того, пептиды, как правило, легко и относительно недорого синтезировать, и они имеют множество возможностей для конъюгирования с визуализирующими агентами, лекарственными препаратами и наночастицами для адресной доставки.

Таким образом, пептиды обеспечивают дополнительные перспективные способы лечения для современной персонализированной/адресной медицины.

### Свойства пептидов

В настоящее время было выделено множество природных пептидов и разработаны искусственные пептиды и пептидомиметики.

Пептиды, которые можно использовать для лечения рака, можно разделить на три основные группы, как показано на Рисунке 1.

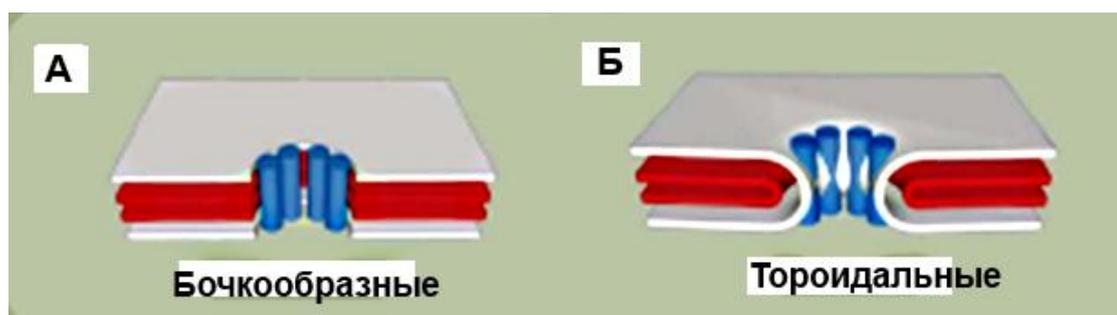


**Рисунок 1** – Классы терапевтических пептидов: **А**) антимикробные пептиды (то есть магайнины или цекропины); **Б**) клеточно-проникающие пептиды (например, пептид ТАТ); **В**) опухоль-таргетные пептиды (пептиды RGD или NGR). Адаптировано из: Boohaker R. J. и Lee M. W., 2012 [62].

В первую группу входят те пептиды, которые обычно существуют в природе или получены из известного белка. Эти пептиды способны связываться с мембраной, могут образовывать поры или разрушать мембраны, и на этом основано их цитотоксическое действие (Рисунок 1, А). Антимикробные пептиды (AMP), такие как цекропины и магайнины, относятся к первой группе, а также «порообразующие» пептиды, полученные из семейства Vsl-2, посредников апоптоза. Во вторую группу входят клеточно-проникающие пептиды (CPP), такие как трансактиватор транскрипции (ТАТ), полученный из вируса иммунодефицита человека, который функционирует как «тройанский конь» и внедряет в клетку связанное с ним лекарство (Рисунок 1, Б). Проблемы, свя-

занные с использованием СРР, таких как ТАТ, обусловлены отсутствием у них специфичности к опухолевым клеткам, они требуют модификации или слияния с опухоль-специфическим лигандом для оптимального противоопухолевого эффекта. Третья группа состоит из таргетных, целенаправленных на опухоль пептидов (ТТР), которые специфичны для опухолевых поверхностных маркеров, таких как мембранные рецепторы, и могут быть использованы для доставки цитотоксических соединений (например, лекарств или цитотоксических пептидов) конкретно в опухолевую ткань или кровеносную систему опухоли (Рисунок 1, В). Примерами таких пептидов являются пептиды с аминокислотной последовательностью RGD (аргинин / глицин / аспарагиновая кислота) или NGR (аспарагин / глицин / аргинин), которые связываются с интегринами или молекулами, расположенными на клеточной поверхности, или рецепторами, которые часто сверхэкспрессируются в опухолевых клетках или в кровеносных сосудах опухоли. СРР могут напрямую проникать через мембраны или, как ТТР, использовать биологически активный механизм, такой как эндоцитоз, для интернализации соединений в клетку. Для создания идеального терапевтического пептида, необходимо интегрировать основные характеристики пептидов из каждой группы: нацеливание на опухоль, проникновение в клеточную мембрану и индукция гибели клетки. Многие пептиды, которые обладают цитотоксичностью по отношению к опухолевым клеткам (т. е. те, что в группе 1, Рисунок 1, А), имеют катионную, амфифильную структуру, которая позволяет им нацеливаться на отрицательно заряженные мембраны раковых клеток (и бактерий), а не на нормальные клетки млекопитающих, и они обладают также порообразующей активностью. Эти пептиды имеют сродство к анионным фосфолипидным группам цитоплазматической мембраны, и они проявляют свои цитотоксические эффекты путем стыковки с мишенью мембраны, вызывая ее деполяризацию [175, 176].

Механизм действия, лежащий в основе деполяризации, в свою очередь, связан со способностью катионных мембранно-активных пептидов образовывать тороидальные поры [175, 176]. В тороидальной поре, по сравнению с порами «бочкообразного ствола», пептиды и липиды собираются в тип организованной, надмолекулярной структуры, вызывая искривление мембраны для формирования поры, через которую могут проходить ионы или небольшие молекулы (Рисунок 2).



**Рисунок 2** – Модели типов пор: А) бочкообразные и Б) тороидальные поры, которые могут быть сформированы антимикробными или порообразующими пептидами. Слои представляют

собой наружную и внутреннюю мембраны, пронизанные цилиндрами, состоящими из пептидов. Адаптировано из: Boohaker R. J. и Lee M. W., 2012 [62].

Альтернативным способом объяснения разрушения мембран пептидами является модель «ковер»; пептиды накапливаются параллельно поверхности мембраны и дестабилизируют мембрану, вызывая повышение ее проницаемости. Другие структурные особенности могут также способствовать цитотоксичности пептида. Например, положение остатка триптофана, входящего в состав катионной области короткого амфипатического пептида, стимулирует электростатические взаимодействия, способствует встраиванию и последующей цитотоксической активности пептида [440].

Такие амфипатические биоактивные пептиды могут также использоваться для «самосборки» с образованием пептидных структур более высокого порядка, которые могут быть направлены непосредственно на мембрану или проникать через мембрану для атаки внутриклеточных мишеней [76].

### **Свойства опухолей**

#### ***Мембраны раковых клеток***

Чтобы быть полезными в качестве противоопухолевых препаратов, цитотоксические пептиды, такие как AMP (Рисунок 1, А), должны быть нацелены на повреждение мембран опухолевых клеток, не разрушая нормальные, нераковые клетки. Важным в этом отношении является тот факт, что клеточные мембраны опухолевых клеток значительно отличаются от мембран нормальных клеток, и это способствует направленному, таргетному действию таких цитотоксических пептидов. Известно, что в нормальных клетках общий заряд мембраны является нейтральным по сравнению с зарядом мембран раковых клеток из-за присутствия цвиттер-ионных фосфолипидов, таких как фосфатидилхолин (PC), сфингомиелин, фосфатидилсерин (PS) и фосфотидилэтанолламин (PE), расположенных на внутренней поверхности плазматической мембраны [51]. Опухолевые клетки, напротив, утрачивают эту мембранную симметрию и выставляют анионный фосфатидилсерин (PS) на наружную часть плазматической мембраны, увеличивая общий отрицательный заряд [554].

Расположение PS связано с метастатическим фенотипом и было показано для многих типов опухолевых тканей [441, 442]. Другим источником повышенного отрицательного заряда на мембране опухолевых клеток являются остатки сиаловой кислоты, связанные с гликолипидами и гликопротеинами, такими как муцин. Муцин 1 (Muc 1) сверхэкспрессируется в клетках рака молочной железы, а также в раковых клетках яичников, поджелудочной железы и легких [39]. Протеогликаны с высоко отрицательно заряженными боковыми цепями, гепаринсульфат и хондроитин сульфат также могут вносить вклад в изменение заряда на поверхности мембран опухолевых клеток [165, 568]. Помимо увеличения отрицательных зарядов на клеточных мембра-

нах раковых клеток, наблюдалось также изменение в текучести мембран при некоторых видах рака, и это могло быть связано с более высоким уровнем холестерина [344, 487, 500, 639]. Другим отличием является увеличение площади поверхности опухолевых клеток из-за большего количества микроворсинок (филаментов) на раковых клетках по сравнению с нормальными клетками [639]. В целом, это указывает на то, что существуют значительные различия между клеточными мембранами раковых и нормальных клеток, которые могут способствовать специфичности цитотоксичных пептидов при терапии онкологических заболеваний.

### ***Сосудистая сеть опухоли***

Солидные опухоли представляют собой особую проблему в лечении онкологических заболеваний, поскольку лекарственные средства, вводимые через кровеносные сосуды, могут проникать в опухолевые ткани только на глубину нескольких клеток [206]. Причины могут включать плохой кровоток через опухолевые сосуды и высокое внутриклеточное давление в опухолях, которые могут возникать из-за аберрантного лимфатического потока [216, 232]. Тем не менее, проблемы с доставкой терапевтических средств в опухоли могут быть преодолены «течкой» опухоли, вызванной быстро растущей и ненормальной опухолевой сосудистой сетью. Это изменение в гидродинамике опухолей вызывает накопление клеточных метаболитов в опухолях при более высоких концентрациях, чем в нормальной ткани [338]. Эти эффекты, называемые усиленной проницаемостью и удерживанием, могут различаться в зависимости от опухоли к опухоли, что вызывает значительную изменчивость в эффективности лечения. Помимо неравномерности и протечек, опухолевые кровеносные сосуды экспрессируют белки поверхностного и внеклеточного матрикса, которые отличаются от нормальных кровеносных сосудов.

Таким образом, альтернативный подход к лечению для улучшения доставки противоопухолевых лекарств к опухолям заключается в непосредственном лечении кровеносных сосудов с использованием нацеленных на опухоль пептидов (Рисунок 1, В), которые локализуются в сосудистой сети опухоли. Экспрессия некоторых из этих белков связана с ангиогенезом. Примерами является сверхэкспрессия некоторых типов  $\alpha\beta$  интегринов [80]. Поскольку эти интегрины сверхэкспрессируются, они могут служить центрами для таргетных пептидов, которые будут накапливаться в сосудистой сети опухоли. Внутриклеточный матрикс также имеет маркеры, которые могут помочь направлять пептиды в опухоли, такие как экспрессия альтернативной формы фибронектина, которая связана с опухолевыми сосудами [390]. Пептиды также могут быть использованы для нацеливания на фибрин-фибронектиновые комплексы в стенках или строме опухолевых кровеносных сосудов [422, 616].

Экспрессия коллагена является еще одной потенциальной мишенью для опухоль-специфичных пептидов. Однако ангиогенез обычно происходит в контексте воспаления, а также в регенерации тканей. Следовательно, нацеливание ангиогенных маркеров на сосудистую

сеть опухоли может также привести к побочному повреждению тканей, подвергающихся восстановлению или отвечающих на инфекции. Таким образом, необходимость в опухоль-таргетных пептидах с более сфокусированным распознаванием молекул, специфичных для сосудистой системы опухоли, является очевидной.

### ***1.1.1. Опухоль-таргетные пептиды***

Противоопухолевая эффективность лекарственного средства или соединения ограничена его проницаемостью через мембраны, адресной доставкой и локализацией в опухолях. Способность нацеливаться на раковые ткани и концентрировать желаемый терапевтический препарат в этих тканях может быть достигнута с помощью опухоль-специфичных маркеров, особенно тех, которые обнаружены на опухоли или в сосудистой сети опухоли. В настоящее время в молекулярной биологии наблюдается открытие сотен опухолевых маркеров-мишеней. Идентификация и характеристика опухолевых маркеров являются основой знаний, на основе которых разрабатываются опухоль-таргетные пептиды (ТТР), также известные как хоминг-пептиды. С помощью метода скрининга фазовых пептидных библиотек и скрининга на основе антител был успешно идентифицирован ряд ТТР, которые функционируют *in vivo* и связываются с молекулами, которые доступны и экспрессируются в сосудистой сети опухоли. Большинство ТТР, которые обеспечивают доставку терапевтических препаратов к опухолям, можно разделить на две основные группы.

К первой группе относятся ТТР, связанные с клеточно-проникающими пептидами (СРР), которые осуществляют транспорт лекарства через клеточную мембрану. Сами по себе эти СРР не являются специфичными; специфичность может быть получена только за счет их связывания с ТТР. Ко второй группе относятся таргетные пептиды, которые могут связываться непосредственно с опухолевым маркером и, как следствие, интернализировать лекарство (cargo) внутрь клетки. Одним из первых открытых СРР был пептид ТАТ, полученный из вируса иммунодефицита человека [172, 194]. Присоединение последовательности ТАТ (GRKKRRQRRRPPQ) позволило интернализировать лекарство из окружающей среды в многочисленные линии опухолевых клеток [541]. К таргетным пептидам второй группы относятся пептиды с последовательностями RGD (аргинин / глицин / аспарагиновая кислота) или NGR (аспарагин / глицин / аргинин), а также пептиды, взаимодействующие специфично с рецепторами опухолей [31]. Эффективное использование ТАТ-подобных и RGD-подобных аминокислотных последовательностей для доставки лекарств в опухоли привело к разработке многочисленных гибридных противоопухолевых соединений, в которых ТТР были связаны с лекарственными средствами или цитотоксическими пептидами.

Многочисленные исследования продемонстрировали полезность слияний ТАТ для проникновения в клетки белков, пептидов или олигонуклеотидов [466]. Одним из примеров было конъюгирование ТАТ с пептидом, который активирует p53. Этот конъюгат использовали для

лечения мышей с имплантированной раковой тканью человека, и он дал положительные результаты [497]. Совсем недавно пептид (с Met-докинг последовательностью), который блокирует взаимодействие между фактором роста гепатоцитов (HGF) и его рецептором Met, был получен с использованием ТАТ. При концентрациях 10–25 мкМ пептид ТАТ-Met ингибировал HGF-опосредованный рост клеток, а более высокие дозы этого пептида повышали его цитотоксичность [93]. Генерирование гибридного соединения, в котором ТАТ был связан с хитозаном и доксорубицином, показало значительное ингибирование роста аденокарциномы СТ26 (значение  $IC_{50}$  было в наномолярном диапазоне), что было в два раза ниже, чем для хитозана и доксорубицина без пептида [284]. Эти исследования продемонстрировали противоопухолевый терапевтический потенциал ТАТ и других CPP, а также необходимость модификаций, позволяющих им нацеливаться на опухоли и концентрировать цитотоксичные соединения. Один из подходов заключается в том, чтобы скрыть катионный CPP во время доставки к опухолевой ткани, а затем выявить мембрано-проникающую активность CPP в центре опухоли. Примерами этого являются pH-чувствительные ТАТ-модифицированные ПЭГ-липосомы или так называемые «умные» соединения [467]. Стерическое препятствие, обеспечиваемое ПЭГ, экранирует пептид ТАТ до тех пор, пока кислотная опухолевая среда не приведет к расщеплению линкера, к которому был присоединен ПЭГ [245]. Эффективность этой системы была показана в липосомальной композиции, включающей доксорубин, которая продемонстрировала цитотоксичность в клетках MCF-7 при  $LC_{50}$  – 2 мкг/мл, по сравнению с 38 мкг/мл для одного доксорубина [263].

### **Пептиды, содержащие RGD и NGR**

Исходя из предположения, что эндотелиальные клетки в кровеносных сосудах опухоли имеют отчетливые белковые маркеры, которых нет в нормальных кровеносных сосудах, была использована библиотека фаговых пептидов, чтобы идентифицировать пептиды, которые «жили бы» в сосудистой сети опухоли [620]. Были обнаружены два пептида с последовательностями, нацеленными на опухоль, один из которых содержал аминокислотные остатки RGD (ArgGlyAsp), а другой имел аминокислотные остатки NGR (AsnGlyArg). Биохимические исследования показали, что RGD обнаруживается в интегрин-центре взаимодействия многих белков экстраклеточного матрикса. Следовательно, RGD распознает класс интегринов, ассоциированных с опухолями, в частности, интегрины  $\alpha\beta3$  и  $\alpha\beta5$ , которые сверхэкспрессируются в ангиогенных кровеносных сосудах [80, 137, 159]. Пептиды NGR распознают и связываются с аминокислотной пептидазой N (также известной как CD13), которая сверхэкспрессируется эндотелиальными клетками многих опухолей, и это может способствовать селективности воздействия на опухоль [620, 409]. Совсем недавно было обнаружено, что NGR-содержащие пептиды превращаются в isoDGR путем деамидирования аспарагина, что приводит к образованию интегриновых лигандов  $\alpha\beta3$ , которые могут влиять на функции эндотелиальных клеток и рост опухоли [118]. Оба

пептида, RGD и NGR, были использованы для адресной доставки противоопухолевых препаратов и прошли разные фазы клинических испытаний на человеке (Таблица 1). Например, пептид RGD (GSSSSGRGDSPA), связанный с ПЭГ, встраивали в мицеллы хитозана, увеличивая тем самым эффективность его поглощения опухолями, которые сверхэкспрессируют интегрины. Это позволило целенаправленно доставлять доксорубин в опухолевые клетки [90]. Используя с(RGDyK), циклический пептид RGD, была достигнута адресная доставка и интернализация мицеллярных наночастиц с лекарствами, в раковые клетки, которые также сверхэкспрессировали интегрины [238]. NGR-содержащие пептиды связывали с доксорубином, и это вызывало подавление роста опухоли у ксенографтов мышей [620]. Совсем недавно NGR был соединен с платиновыми противоопухолевыми препаратами для усиления их адресной доставки и включения в опухоли [381]. Эта NGR-последовательность специфически локализовалась в солидных опухолях и в эндотелии ангиогенных кровеносных сосудов, и также доставляла липосомальный доксорубин для лечения ортотопической нейробластомы ксенографтов мышей [411, 412].

**Таблица 1** – Доклинические и клинические испытания терапевтических пептидов. Адаптировано из: Boohaker R. J. и Lee M. W., 2012 [62].

<i>Название пептида</i>	<i>Терапевтическое применение</i>	<i>Фаза клинических испытаний</i>
<i>Пептиды группы 1</i>		
Цекропин А и В	<b>Рак:</b> Лейкемия Мочевой пузырь	Доклинические Доклинические
Плейроцидин	<b>Рак:</b> грудь	Доклинические
Магайнин 2	<b>Рак:</b> Мочевой пузырь <b>Анти-микробные:</b> диабетические язвы стопы	Доклинические Фаза III
β-дефензин	<b>Анти-микробные:</b> Биомаркер воспаления	Фаза IV
α5-α6 Вах пептид	<b>Рак:</b> апоптоз	Доклинические
ВН3 домен	<b>Рак:</b> апоптоз	Доклинические
KLAKLAK	<b>Рак:</b> глиобластома	Доклинические
<i>Пептиды группы 2</i>		
Tat	<b>Рак: HIV:</b> вакцина	Доклинические. Фаза I, II
<i>Пептиды группы 3</i>		
RGD (Cilengitide, Delta 24-RGD, Delta 24-RGD 4C, RGD-K5)	<b>Рак:</b> Мозг Яичники Голова и шея Предстательная железа	Фаза I Фаза I Фаза I, II Фаза II

	Легкие Меланома	Фаза I, II Фаза II
NGR (NGR-hTNF)	Рак: Яичники Легкие Саркома	Фаза II Фаза II Фаза II

Пептид NGR, слитый с актиновым фрагментом 15 кДа, индуцировал апоптоз *in vitro* путем интеграции в цитоскелет [289]. Пептиды NGR и/или STR-R4, прикрепленные к дистальным концам ПЭГ на липосомах, усиливали поглощение липосом в CD13-позитивных клетках [516]. В соответствии с такими результатами была получена соль циклизованного пентапептида (циленгитид) на основе RGD (EMD 121974, Merck). Циленгитид прошел тестирование I, II и III фазы клинических испытаний для немелкоклеточного рака легких, глиомы, рака головы и шеи, рака простаты и многих других. Применение циленгитида для пациентов с глиобластомой в исследованиях II фазы приводило к тому, что выживаемость составила 12–15% без прогрессирования в течение шести месяцев [190, 438].

Другим многообещающим подходом является доставка в клетки фактора некроза опухоли (TNF) через пептиды RGD или NGR. В отношении NGR-hTNF проводится ряд клинических испытаний II-III фазы для рака яичников, легких, толстой кишки и других видов рака (Таблица 1). При использовании NGR-hTNF в группе пациентов с гепатоцеллюлярной карциномой токсичность была минимальной или отсутствовала, и была достигнута средняя выживаемость 8,9 месяцев (в среднем 6 месяцев) [462]. Следующее поколение RGD-пептидов разрабатывалось для улучшения проникновения противоопухолевых препаратов в опухоли. Проникновение лекарств в опухолевую ткань является проблемой, учитывая, что кровоток через опухолевые сосуды может быть ненормальным, а опухоли могут иметь высокое внутреннее давление [206, 232]. Новые RGD-пептиды были связаны с ткань-проникающим мотивом, R/KXXR/K, который должен подвергаться действию так называемого правила C-конца (CendR). Был разработан пептид RGD, содержащий мотив CendR, iRGD, который связывался с интегринами, а затем при протеолитическом расщеплении продуцировал мотив CendR, который позволял связываться с нейропилином-1 (NRP-1), вызывая проникновение в ткани [509, 510]. Потенциальное применение iRGD – это увеличение количества лекарств, проникающих в опухоли. Комбинирование iRGD с такими препаратами, как паклитаксел (таксол) или доксорубин, позволило увеличить накопление препаратов в опухолевых тканях, что указывает на его возможное использование в комбинированной терапии [509].

### **Природные пептиды-лиганды**

Природные пептиды-лиганды играют ключевую роль в функционировании клеток и в межклеточных взаимодействиях, при этом они состоят из совокупности аминокислот, связан-

ных амидными связями, и содержат обычно менее ста мономеров. Их низкий молекулярный вес позволяет им быстро выводиться из крови, а их высокая специфичность связывания приводит к тому, что их активная концентрация в опухоли достигается при наномолярных количествах. Интересно, что пептиды-лиганды являются очень гибкими относительно их химического состава. Показано, что легко могут быть разработаны такие модификации пептидов, как циклизация, использование неприродных D-аминокислот или их комбинации, связанные с химическими линкерами. Применение пептидов-лигандов обычно определяется избыточной экспрессией опухоли-специфичных рецепторов. Накопление пептида-лиганда в опухоли коррелирует с сверхэкспрессией рецептора, позволяя отличить опухолевую ткань от нормальной. Поэтому пептиды, конъюгированные с такими разнообразными соединениями, как флуоресцентные красители, радионуклиды или частицы оксида железа, используются для оптической, позитронной эмиссионной томографии или для однофотонной эмиссионной компьютерной томографии, а также для магнитно-резонансной томографии.

Идеальный таргетный пептид-лиганд должен накапливаться в мишени, а не в нормальных тканях, и в случае применения для визуализации рака он должен быстро удаляться из обращения, чтобы минимизировать фон и усилить специфичный сигнал по отношению к шуму [511].

В случае доставки лекарств накопление конъюгата «пептид-лекарство» в мишени будет увеличить эффективность препарата и уменьшать побочные эффекты.

Следует отметить, что недавно появились новые тераностические средства, подходящие для использования, как в визуализации, так и в терапии рака [326]. Такие природные пептиды-лиганды применяются для визуализации периферических раковых заболеваний, таких как рак молочной железы, предстательной железы и меланомы.

Аминокислотные последовательности таргетных пептидов-лигандов можно определять с помощью различных методов. Эти методы включают разработку производных последовательностей природных белков, таких как, например, ростовой фактор эндотелиальных сосудов (VEGF) и соматостатин (SST) или скрининг библиотек пептидов, состоящих из миллиардов коротких случайных аминокислотных последовательностей, расположенных на вирусных частицах [278, 525, 581, 631].

### **Производные соматостатина**

Многие солидные опухоли часто связаны с сверхэкспрессией G-белок-связанных рецепторов (GPCR) и рецепторов соматостатина (SSTR), которые активируются пептидами-лигандами. Семейство SSTR включает пять рецепторов (от SSTR1 до 5), которые широко распространены в центральной нервной системе, гипофизной железе и многих периферических органах. Установлено, что связывание природного пептида-лиганда соматостатина (SST) к рецепторам приводит к ингибированию пролиферации и/или индукции апоптоза в раковых клетках

[581]. Рецепторы соматостатина SSTR2 и 5 значительно сверхэкспрессируются при раке молочной железы, что позволяет использовать их в качестве противоопухолевых мишеней. Соматостатин проявляет высокое сродство к рецепторам, но имеет удивительно короткий период полураспада, он существует в плазме крови только от 1 до 3 минут [581]. Чтобы преодолеть эту проблему был разработан SST аналог, циклический SSTR-агонист октапептид, называемый октреотидом (SMS 201–995; DFCFDWKTCT), который содержит D-аминокислоты в SST цепи и избирательно связывает SSTR2 и 5. По сравнению с SST октреотид значительно увеличивал период полураспада в плазме до 113 мин [134]. Другим примером модификаций природного пептида-лиганда является встраивание молекул жирных кислот в процессе липофилизации, что позволяет увеличить стабильность и биологическую активность пептида, не вызывая конформационных изменений. Например, добавление 12, 14 или 16 атомов углерода к другому SST аналогу RC-160 (DFCYDWKVCW) с коротким периодом полураспада в сыворотке приводило к повышению стабильности и 10-кратному увеличению эффективности действия по сравнению с самим RC-160 [127]. Рецепторы соматостатина SSTR 2 и 5 также использовались для визуализации первичных опухолей простаты и метастазирования костей в ПЭТ/КТ у 20 пациентов. Однако экспрессия SSTR 2 и 5 в опухолевой ткани большинства исследуемых пациентов была слишком низкой для рецептор-опосредованной доставки лекарств [318].

#### **Пептидные производные гастрин высвобождающего пептида (GRP)**

Недавно опубликованы результаты исследований, которые сообщают, что рецептор гастрин высвобождающего пептида (GRPR), связан с прогрессированием рака предстательной железы, а также сверхэкспрессируется в 62–96% случаев в первичных опухолях молочной железы [125]. Природный гастрин высвобождающий пептид (GRP) обладает высоким сродством к рецептору GRPR. Бомбезин (YQRLGNQ-WAVGHLM) и его производные, являющиеся аналогами гастрин высвобождающего пептида (GRP), были изучены наиболее подробно на многих линиях опухолевых клеток человека и на опухоли ксенографтов, включая рак молочной железы [47, 330, 407]. Эти исследования показали, что аналоги бомбезина могут быть полезны для обнаружения опухолей молочной железы человека, экспрессирующих GRPR, методом ПЭТ. Подобно системе SSTR, эти пептиды, состоящие из C-концевой модификации бомбезина, были успешно использованы для визуализации опухоли предстательной железы с помощью ПЭТ и КТ у мышей и человека [97, 329, 377, 589, 614]. Было также высказано предположение, что сам бомбезин может быть использован в качестве таргетного пептида для диагностики рака предстательной железы и пораженных лимфатических узлов у пациентов [589]. Однако последующее исследование опровергло это предложение из-за очень низкой метаболической стабильности бомбезина [133]. Удивительно, но бомбезин показал неожиданно быструю деградацию у пациентов

*in vivo*, даже несмотря на то, что в сыворотке человека наблюдался длительный период полураспада *in vitro* [30].

Другим примером пептидов-лигандов является природный лиганд  $\alpha$ -меланоцит-стимулятор-гормона ( $\alpha$ -MSH), который специфично связывается с рецептором меланокортина-1 (MC1R). Рецептор меланокортина-1 экспрессируется меланоцитами в нормальной ткани и играет ключевую роль в синтезе эпидермальных меланиновых пигментов и в фотозащитном ответе через активацию путей репарации ДНК и антиоксидантной защиты. Так как MC1R сильно сверхэкспрессируется в первичных меланомах и их метастазах, были разработаны методы визуализации с использованием нескольких пептидных фрагментов, полученных из  $\alpha$ -меланоцит-стимулятор-гормона ( $\alpha$ -MSH) [156]. В течение последнего десятилетия миметики MC1R-лиганда, радио-флуорированные металлопептиды, были разработаны для ПЭТ-визуализации опухоли. Для СПЕКТ-визуализации были разработаны лактам-циклические аналоги  $\alpha$ -MSH, которые могут также использоваться в ПЭТ, когда этот циклический  $\alpha$ -MSH связан с остатками DOTA [626]. Все синтетические пептиды показали лучшее накопление в опухоли по сравнению с радиоактивно-мечеными эндогенными лигандами в доклинических исследованиях. Совсем недавно сериновая протеаза (гранзим В), которая является молекулярной мишенью иммунной системы, была использована для визуализации меланомы [200, 596]. Доклинические исследования показали, что гранзим В, который играет главную роль при гибели раковых клеток, и высвобождается Т-клетками, может использоваться как биомаркер раннего ответа опухоли на иммунотерапию [281]. Был разработан пептид (GZP), который необратимо связывался с гранзимом В. Затем этот GZP-пептид конъюгировали с  $[^{68}\text{Ga}]\text{-DOTA}$  и применяли для ПЭТ / КТ-визуализации опухоли. Было показано, что мыши, имеющие меланому, получали иммунопрепараты и GZP, и это позволило различать обработанные иммунными препаратами чувствительные опухоли от резистентных на основе уровня гранзима В в опухолях [281].

### ***1.1.2. Анти-микробные пептиды***

Анти-микробные пептиды (или так называемые защитные пептиды хозяина или катионные анти-микробные пептиды) являются низкомолекулярными молекулами (10–40 аминокислот) с катионной амфипатической структурой, которая позволяет им взаимодействовать с анионными мембранными липидами. Природные AMP являются частью внутреннего защитного иммунного ответа к различным микробам, и они обнаруживаются в животных, амфибиях и насекомых. Из-за того, что AMP нацелены на мембраны, AMP могут использоваться как альтернативные противоопухолевые препараты. В настоящее время в базах данных находится более чем 100 AMP, которые обладают потенциальной противоопухолевой активностью [578]. AMP имеют ряд преимуществ перед другими пептидами. Поскольку липиды мембран являются главной

мишенью большинства АМР, развитие лекарственной устойчивости является менее вероятным, так как через минуты после введения пептида происходит разрушение мембраны [413]. АМР могут индуцировать гибель опухолевых клеток через два главных механизма: апоптоз или некроз. Некротический путь гибели является результатом АМР-таргетинга отрицательно заряженных молекул на клеточной мембране раковых клеток, приводя к лизису клетки, в то время как апоптоз является следствием разрушения митохондриальной мембраны. АМР-опосредованное растворение мембраны (пермеабиллизация) может происходить через различные механизмы, такие как образование «бочкообразных пор» (barrel stave), «ковровая» модель нарушения мембраны, образование организованных каналов или «тороидальных» пор (Рис. 2). АМР также проявляют немембранную активность, такую как активация иммунных механизмов, что приводит к гибели опухолевых клеток [107].

### **Магайнины**

Магайнины, полученные из кожи африканской когтистой лягушки (*Xenopus laevis*), были одними из первых АМР, протестированных на противоопухолевую активность [625]. Ранние работы показали, что магайнин 2 имел амфифильную  $\alpha$ -спиральную структуру, которая образовывала поры в мембранах [121]. Локальная обработка магайнином 2 опухолей мышей (ксенографты) приводила к исчезновению опухолей [498]. Многочисленные данные подтвердили цитотоксическое действие магайнина 2 при меланоме, раке молочной железы и легких. Установлено, что магайнин 2 эффективно ингибировал пролиферацию опухолевых клеток мочевого пузыря при  $IC_{50}$  в диапазоне от 31 до 135 мкМ [287]. Кроме того, было показано, что противоопухолевые эффекты магайнинов являются специфичными. Было обнаружено, что низкие концентрации магайнинов являются токсичными по отношению к раковым клеткам, но не к лимфоцитам или фибробластам. Также было установлено, что магайнины являются устойчивыми к протеолизу в сыворотке [339, 498]. Показано, что конъюгирование магайнина 2 с опухольтаргетным пептидом бомбезином усиливало противоопухолевую активность конъюгатного пептида (MG2B) [136]. Следует отметить, что бомбезин сам по себе не является цитотоксичным, однако при конъюгации с MG2B, он проявлял токсичность по отношению к раковым клеткам молочной железы и меланомы ( $IC_{50}$  10–15 мкМ). Эта величина  $IC_{50}$  была примерно в 10 раз ниже, чем для неконъюгированного магайнина 2, и в 6–10 ниже, чем  $IC_{50}$  для нормальных клеток, фибробластов [309]. Применение магайнина 2 в качестве противоопухолевого средства является перспективным, потому что механизм его действия препятствует развитию лекарственной устойчивости [303].

### **Цекропины**

Цекропины А и В относятся к семейству цекропинов АМР, выделенных из гемолимфы гигантской шелковой бабочки (*Hyalophora cecropia*), и позднее они были обнаружены также у

млекопитающих. Структура обоих цекропинов А и В состоит из двух  $\alpha$ -спиралей, несущих амфипатический N-конец и гидрофобный С-конец с цитотоксической противоопухолевой активностью, связанной с особенностями N-конца [224, 505]. Оба цекропина А и В могут лизировать раковые клетки в концентрациях ниже, чем концентрации, которые повреждают нормальные клетки [103, 226]. Цекропин В и его аналоги демонстрировали значения  $IC_{50}$  в диапазоне от 3 до 17 мкМ для различных линий опухолевых клеток, таких как HL-60, K-562 или Jurkat клетки, тогда как значения  $IC_{50}$  для фибробластов 3Т3 составляли  $> 50$  мкМ [103]. Цекропин В также проявлял *in vitro* противоопухолевую активность против раковых клеток молочной железы и яичников человека, а также оказывал противоопухолевое действие *in vivo* на аденокарциному толстой кишки [366]. Антимикробные пептиды из семейства цекропинов обладают селективной и цитотоксической эффективностью, воздействуя на неполярные липиды клеточных мембран и формируя ион-проницаемые каналы, как было показано при инвазивном раке мочевого пузыря [512]. В случае опухолевых клеток мочевого пузыря средние значения  $IC_{50}$  для жизнеспособности клеток находились в диапазоне от 185 до 251 мкг/мл, причем эти дозы были намного ниже, чем для фибробластов [512]. Синергический летальный эффект наблюдался при сочетании цекропина А с 5-фторурацилом при лечении лейкемии человека [226].

### **Дефензины**

Дефензины относятся к одной из подгрупп АМР с вариациями структуры  $\beta$ -листа [234, 273]. Дефензины – это небольшие (3,5–4 кДа), богатые цистеином пептиды, которые обнаруживаются у млекопитающих, насекомых, растений и грибов [273]. В организме человека также вырабатываются  $\alpha$ - и  $\beta$ -дефензины как часть врожденного иммунного ответа на патогены. Альфа-дефензины (HNP1, HNP2, HNP3) были обнаружены в гранулах нейтрофилов и эпителиальных клеток кишечника (HD5, HD6), тогда как бета-дефензины были найдены в слизистой среде [243]. Альфа-дефензины способны проникать через клеточные мембраны за счет образования каналов в липидных бислоях [243]. В результате исследований дефензины были обнаружены в жидкостях и клетках, связанных со злокачественными новообразованиями [148]. При колоректальном раке уровни HNP1–3 были повышены в опухолевых тканях по сравнению с нормальными тканями [353]. Такие исследования предполагали, что дефензины могут быть использованы в качестве биомаркеров для раннего выявления рака. В качестве терапевтического средства сообщалось о цитотоксической активности HNPs1–3 для опухолевых клеток человека, в частности, HNP1 (100 мкг/мл) демонстрировал значительную цитотоксичность в отношении плоскоклеточного рака полости рта [350]. Другие противоопухолевые эффекты, документированные для HNP, включают способность вызывать повреждение ДНК и препятствовать неоваскуляризации опухолей [100, 187]. Однако существует одна проблема при использовании дефензинов, которая заключается в том, что HNP-опосредованная цитотоксичность не является специфич-

ной. Дефензины способны вызывать не только лизис опухолевых клеток, но также и лизис нормальных лейкоцитов или эпителиальных клеток и, кроме того, они ингибируются сывороткой [302, 391]. Для решения этой проблемы были разработаны новые варианты дефензинов. Коприсин является дефензин-подобным пептидом насекомых, из которого был синтезирован синтетический пептид (катионный 9-мерный димер), называемый CopA3 [254]. CopA3 проявлял антимикробную активность и ингибировал рост раковых клеток поджелудочной железы ( $IC_{50} = 61,7$  мкМ) и гепатоцеллюлярных клеток ( $IC_{50} = 67,8$  мкМ). Этот пептид является примером синтетического пептида, разработанного на основе природного вещества, который проявляет ингибирующую активность в отношении микробов и потенциально может использоваться в качестве нового противоопухолевого средства.

### **Плевроцидин**

Плевроцидин был первоначально выделен из камбалы (*Pleuronectes americanus*), которая экспрессирует высокие уровни биоактивных пептидов в результате сильного иммунного ответа [114]. Подобно другим AMP плевроцидин обладает сигнальной последовательностью на N-конце и кислой аминокислотной последовательностью на C-конце, которая может стимулировать секрецию, обеспечивать образование пор и тем самым защищать организм от вредного воздействия микробов [114]. Такие консервативные последовательности являются общими и для других AMP [621]. Используя последовательности из консервативных областей плевроцидина, были обнаружены новые плевроцидин-подобные катионные AMP, обладающие антибактериальной активностью [415]. Два из них, NRC-03 и NRC-07, также обладали противоопухолевой активностью против клеток рака молочной железы [415]. Изучение последовательности NRC-03 показало наличие неструктурированного катионного amino-конца и  $\alpha$ -спирального сегмента, связанного с двумя остатками глицина [181]. В ходе исследования последовательности NRC-07 было установлено, что он также может образовывать  $\alpha$ -спираль. Последующая оценка противоопухолевого действия показала, что как NRC-03, так и NRC-07 могли убивать клетки рака молочной железы и усиливать токсичность химиотерапевтических препаратов, таких как цисплатин или доцетаксел [181]. При концентрации 50 мкМ оба пептида NRC-03 и NRC-07 продемонстрировали цитотоксичность в отношении клеток рака молочной железы (75–94%) [415]. Оценка жизнеспособности клеток, обработанных NRC-03 и NRC-07, показала, что эти пептиды вызывали гибель клеток, связываясь с отрицательно заряженными молекулами на клеточной мембране. Смерть клеток могла также наступать при потере целостности митохондриальной мембраны. Кроме того, оба пептида могли ингибировать рост опухоли молочной железы на мышинной модели ксенографтов [220]. Интересно, что семейство плевроцидинов также проявляет цитотоксичность по отношению к медленно растущим раковым клеткам, которые сверхэкспрессируют Р-гликопротеин [220].

### **Пептиды семейства Bcl-2 и миметики BНЗ**

Митохондрии играют центральную роль в апоптотическом процессе. Межмембранное пространство митохондрий содержит множество белков, которые являются факторами гибели клеток, классическим примером является цитохром С. Контроль за высвобождением факторов, индуцирующих апоптоз, таких как цитохром С, из митохондрий регулируется семейством белков Bcl-2. Семейство Bcl-2 состоит из двух групп: анти-апоптотических белков, таких как Bcl-2, Bcl-XL и Mcl-1, и проапоптотических белков, таких как Bax, Bak, Bid, Bim или Bad [282]. Последняя группа подразделяется на мультидоменные эффекторы гибели клеток, такие как Bax или Bak, и белки BНЗ, такие как Bad, Bim или Bid, которые регулируют активность анти- или проапоптотических факторов [477]. Механизм действия белков семейства Bcl-2 зависит от их способности связываться с органеллами, особенно с митохондриями или эндоплазматическим ретикулом, и вызывать эффекты, которые приводят к высвобождению апоптотических факторов. Характеристика этой активности на молекулярном уровне является сложной задачей, поскольку белки Bcl-2 могут принимать различные конформации в растворимой или мембраносвязанной форме. Однако сходство структуры с порообразующими белками, такими как колицин или токсины, позволило предположить, что белки Bcl-2, вероятно, обладают порообразующей активностью [111, 370, 513]. Этот эффект пермеабилзации мембраны был продемонстрирован с помощью белков Bax и Bid (с Bax), при этом было исследовано влияние Bax или Bid на активность порообразования [162, 457]. Из-за своей важности в регуляции апоптотической активности белки Bcl-2 часто мутируют в раковых клетках, чтобы нарушить регуляцию выживания клеток [146, 219, 397]. Действительно, сам Bcl-2 является одним из первых примеров онкогенов, что указывает на роль этого семейства белков в онкогенезе и образовании опухоли [558]. Высвобождение факторов, индуцирующих апоптоз, из митохондрий зависит от баланса белков Bcl-2, причем судьба клеток определяется избыточной экспрессией одной группы над другой. Для терапевтической индукции гибели раковых клеток усилия направлены на разработку реагентов, которые либо нарушают баланс между про- и антиапоптотическими белками Bcl-2, либо непосредственно нарушают целостность митохондриальной мембраны. Bax-родственные, порообразующие пептиды и BНЗ-родственные пептиды и миметики, являются яркими примерами этих усилий.

### **BНЗ-родственные пептиды и миметики**

Сверхэкспрессия анти-апоптотических белков, таких как Bcl-2 или Mcl-1, нарушает баланс в пользу выживания клеток и частично лежит в основе развития лекарственной устойчивости к традиционной терапии или химиотерапии [363, 468]. Из этого следует, что вмешательство в способность Bcl-2 анти-апоптотических белков взаимодействовать и ингибировать проапоптотические белки, такие как Bax, может восстанавливать апоптоз в раковых клетках. Это

явилось предпосылкой использования пептидов ВНЗ и разработки миметиков ВНЗ. Было показано, что пептид, содержащий домен ВНЗ из Вах, вызывал апоптоз в обработанных клетках, но этот эффект был обусловлен вмешательством во взаимодействие между Вах и Bcl-XL, а не прямой способностью пептида активировать Вах или индуцировать его транслокацию в митохондрии [368]. Такие данные указывали на то, что молекулы на основе доменов ВНЗ белков Bcl-2 могут способствовать апоптозу опухолевых клеток, блокируя связь между про-апоптотическими многодоменными белками и анти-апоптотическими аналогами. Однако такие пептиды имели плохую клеточную проницаемость, проблемы с растворимостью и стабильностью, а также они были неспособны специфично взаимодействовать с опухолевыми клетками и вызывать их лизис. Чтобы решить эту проблему, пептид Bid ВНЗ был модифицирован с использованием химической сшивки для стабилизации его  $\alpha$ -спиральной конформации [573]. Сшитый пептид ВНЗ Bid был способен активировать Вах, устойчив к деградации протеазами и, сохраняя свою  $\alpha$ -спиральную форму, мог проникать через клеточные мембраны и вызывать апоптоз, как было показано *in vitro* и *in vivo* с клетками лейкоза [419]. Успех с модифицированными пептидами ВНЗ и знание структуры белков Bcl-2 и Bcl-XL привели к созданию малых молекул или миметиков ВНЗ [131]. Этот пример понимания функции белка и того, как полученные пептиды влияют на активность белка, смогли привести к разработке фармакологических препаратов, которые имитировали действие пептида. Три различных класса миметиков ВНЗ имели значительный успех в подавлении роста раковых клеток *in vitro* и при проведении доклинических и клинических испытаний на опухолях животных и человека. Первый из них, пептид Navitoclax/ABT-737, представляет собой молекулярный миметик белка ВНЗ, который проявлял цитотоксичность в моделях опухолей *in vitro* ( $IC_{50} < 10$  нМ) и *in vivo* (75 мг/кг/день) [336, 555]. Эти соединения были селективными по отношению к Bcl-2 и Bcl-XL и, в меньшей степени, к Mcl-1 [261, 618]. Второй пептид Obatoclax имел меньшее сродство к Bcl-2, но большее к Mcl-1, тогда как третий миметик AT-101 обладал умеренным сродством к Bcl-2, Bcl-XL и Mcl-1 и мог нарушать взаимодействия между Bcl-XL и Вах или Bad [291]. Хотя сродство к Bcl-2 анти-апоптотическим белкам является особенностью этих соединений (особенно для Obatoclax и AT-101), они также продемонстрировали значительные противоопухолевые эффекты, которые не зависели от их ВНЗ-миметических свойств [252]. Эти «нецелевые» эффекты были такими же значимыми и критическими, как и их ингибирующая активность к Bcl-2/Bcl-XL/Mcl-1 [252]. В клинических испытаниях Navitoclax продемонстрировал токсичность в отношении отдельных гематологических злокачественных новообразований [444, 592].

### **1.1.3. Клеточно-проникающие пептиды**

Клеточно-проникающие пептиды (СРР) представляют собой большой класс пептидов, состоящих из коротких аминокислотных последовательностей (5–30 остатков). Эти пептиды способны проходить через биологические мембраны и доставлять внутрь клетки многочисленные соединения, включая небольшие молекулы, нуклеиновые кислоты, белки, вирусы, агенты для визуализации опухоли, лекарства для лечения рака [198, 215]. Впервые такой пептид, способный проходить через клеточную мембрану, был обнаружен независимо двумя группами исследователей в 1988 году [172, 431]. Они обнаружили, что транс-активирующий белок вируса иммунодефицита человека (ТАТ 1) способен проникать в культивируемые клетки, транслоцироваться в ядре и трансактивировать экспрессию вирусных генов. Было обнаружено, что альфа-спиральный домен этого белка ТАТ, в основном, состоящий из остатков основных аминокислот (aa48-60), отвечал за эту клеточную интернализацию и ядерную транслокацию [450, 570]. Было показано, что додекапептид GRKKRRQRRRPQ этого белка ТАТ является минимальной функциональной молекулой, и многие СРР были получены из этой исходной последовательности [405]. В 1991 году было показано, что гомеодомен, кодируемый геном *Antennapedia of Drosophila melanogaster*, проникал через мембрану нейронов, транслоцировался в ядре и вызывал морфологическую дифференцировку нейронов [239]. Пептид из 16 аминокислот (RQIKIWFQNRRMKWKK) третьей спирали гомеодомена *Antennapedia*, а именно пептид пенетратин (*Penetratin*), был способен эффективно проходить через клеточные мембраны с помощью энергонезависимого механизма [135]. В течение тридцати лет клеточно-проникающие пептиды использовались в фундаментальных исследованиях, а также для лечения ряда заболеваний, таких как инфекционные, воспалительные, нейродегенеративные и онкологические [557]. Однако только несколько пептидов прошли клинические испытания вследствие ограниченной проницаемости плазматических мембран, низкой эффективности доставки и низкой специфичности для опухолевых клеток-мишеней. Несколько экспериментальных подходов было разработано для получения активных пептидов, способных целенаправленно достигать раковых клеток и доставлять противоопухолевые препараты внутрь клетки. Преимущества доставки лекарств на основе пептидов по сравнению с другими способами доставки являются весьма многочисленными. Пептиды не являются иммуногенными молекулами, обычно они не цитотоксичны, стабильны в физиологических условиях и способны эффективно доставлять в клетки различные соединения, такие как белки, другие пептиды или нуклеиновые кислоты [66, 333, 465].

#### **Химические свойства клеточно-проникающих пептидов**

По своему происхождению СРР классифицируются как: 1) СРР, происходящие из белков, включая ТАТ белок и пенетратин; 2) химерные СРР, такие как транспортан, полученный в результате связывания N-конца нейропептида галанина с токсином мастопараном; и 3) синтетические СРР, содержащие олигоаргинины и многочисленные пептидные нуклеиновые кислоты

(PNAs), образованные синтетическими аналогами нуклеиновых кислот, связанными с псевдопептидным остовом [358,465]. В настоящее время общедоступная база данных CPP (<http://crdd.osdd.net/raghava/cppsite/>) содержит приблизительно 1700 различных пептидов [12]. Большинство из них представляют собой линейные последовательности (94,5%), преимущественно состоящие из L-аминокислот (84,3%), и в основном получены посредством химического синтеза (54,8%) [12].

На основании их физических и химических свойств CPPs классифицируются как катионные, амфипатические и гидрофобные пептиды [427]. Большинство катионных CPPs происходит из природных пептидов ТАТ и пенетратина и обычно содержит более пяти положительно заряженных аминокислот [517]. Полиаргининовые пептиды показывают самый высокий уровень интернализации клетками и, таким образом, они обладают более высоким терапевтическим потенциалом [26]. Фактически гуанидиновые группы в аргининах образуют бидентатные водородные связи с отрицательно заряженными карбоксильными, сульфатными и фосфатными группами белков, мукополисахаридов и фосфолипидов клеточной мембраны, что приводит к интернализации пептидов внутрь клетки в физиологических условиях [445]. Помимо аргинина, другие аминокислоты эффективно способствуют транслокации катионных CPPs через клеточную мембрану. Так, например, добавление четырех триптофановых остатков в середине или вдоль последовательности CPP показало повышение клеточной интернализации [454]. В то же время удаление триптофана в мутированном пенетратине (W48F), в котором остаток Trp48 был замещен на Phe, и в пенетратине (W48F / W56F), в котором Trp48 и Trp56 были замещены на Phe, приводило к уменьшению или полному отсутствию интернализации [138].

Таким образом, было показано, что триптофан играет ключевую роль во взаимодействии CPP с фосфолипидным бислоем плазматической мембраны [44].

#### ***1.1.4. Клеточно-проникающие пептиды и доставка противоопухолевых препаратов***

Рак является основной причиной смерти во всем мире, а химиотерапия – наиболее распространенный подход к терапии онкологических заболеваний [166].

Однако основными проблемами химиотерапии являются плохое проникновение лекарств в опухолевые ткани, появление лекарственной устойчивости опухолей, а также различные побочные эффекты. Низкое проникновение лекарств в опухолевые ткани обусловлено наличием аденозной соединительной стромы, которая препятствует проникновению молекул в опухолевую ткань (например, при раке поджелудочной железы), а также наличием высокого межклеточного давления и лимфатическими сосудами опухоли. В этом случае только CPPs могут улучшить доставку лекарственного средства в опухолевые клетки, облегчая его интернализа-

цию, и при этом, не влияя на нормальные ткани. Терапевтические стратегии, в которых используются пептиды, распознающие молекулы-мишени, специфичные для опухолевых клеток, позволяют концентрировать в опухолевой ткани необходимое количество лекарственного средства, способного подавлять рост опухоли. В этом случае наблюдается повышение чувствительности опухоли к лекарству и понижение токсичности для здоровых тканей, так как лекарство локализуется и накапливается преимущественно в опухоли [452].

#### **CPPs для доставки химиотерапевтических агентов**

Конъюгация некоторых противоопухолевых препаратов, таких как таксол, метотрексат (MTX), доксорубин с CPPs, повышает проницаемость мембран, доставку лекарств, период циркуляции лекарств и накопление их в опухолевых клетках [33, 129, 153, 301, 366]. Показано, что пептид R8 CPP, связанный с таксолом через дисульфидные связи, улучшал растворимость в воде и фармакокинетику лекарственного средства, а также преодолевал множественную лекарственную устойчивость [153]. Было показано, что MTX, конъюгированный с двумя различными CPPs, а именно, с YTA2 (ацетил-YTAIAWVKAFIRKLRK-амид) и YTA4 (ацетил-IAWVKAFIRKLRKGPLG-амид) убивал раковые клетки более эффективно, чем только один MTX [301]. Установлено, что многие CPPs, конъюгированные с доксорубицином, улучшали внутриклеточную доставку препарата. Установлено, что наиболее часто используемые пептиды TAT и пенетратин вызывали апоптоз опухолевых клеток у хомяков (CHO) и у человека (HUVEC, MDA-MB-231, MCF-7) при низких дозах [32, 33].

Исследования показали, что интернализация некоторых флуоресцентно-меченых лекарств (в частности, ламивудина) в клетки аденокарциномы яичников (SKOV3) значительно увеличивалась благодаря конъюгации с циклическим пептидом [WR]4-AuNP [379]. Этот пептид, содержащий остатки триптофана и аргинина, показал низкую цитотоксичность и улучшал клеточное поглощение и доставку лекарственного средства [379]. Кроме того, винкристин или паклитаксел, конъюгированный с R7 CPP, а также TATp-модифицированные PEG-PE мицеллы показали значительное увеличение цитотоксичности *in vitro* для различных раковых клеток [104].

#### **CPPs и доставка нуклеиновых кислот для противоопухолевой терапии**

В настоящее время CPPs широко используют для доставки нуклеиновых кислот в клетки. Разработаны комплексы, состоящие из олигонуклеотидов CPPs и плазмидной ДНК, которые встраивают в наночастицы, обладающие положительным зарядом. Этот заряд позволяет им взаимодействовать с клеточными мембранами и тем самым интернализировать комплексы CPP-лекарство в клетку [61, 401]. Было продемонстрировано, что применение аргинин-обогащенных CPPs (SR9, PR9 и HR9) для переноса плазмидной ДНК в клетки A549 повышало уровень экспрессии генов [306].

Показано, что пептид PepFect14 может доставлять плазмидную ДНК, образуя стабильные наночастицы, которые улучшали эффективность трансфекции в клеточных культурах путем кальвеол-опосредованного эндоцитоза [306, 353, 560].

### **СРР и доставка белков для противоопухолевой терапии**

Недавно появилось новое направление трансляционных исследований, которое сосредоточено на использовании терапевтических белков и вакцинных пептидов в противоопухолевой терапии. Первым ответом на вакцину на основе пептида является гуморальный ответ образования антител. Активация цитотоксических Т-лимфоцитов требует процессинга антигена по пути МНС класса I, а СРР может способствовать цитозольному поглощению вакцинных пептидов через МНСI. Показано, что LAN4, клеточно-проникающий пептид, усиливал клеточную доставку пептидной вакцины, тирозиназы, связанной с белком 2 (TRP2), вызывая противоопухолевый эффект в опухолевых тканях мышей [144, 630]. Новый амфипатический СРР, p28 был получен из окислительно-восстановительного белка азурина, выделенного из патогена *Pseudomonas aeruginosa*. Установлено, что минимальный белковый домен азурина (aa 50-67), названный p18, обладал клеточно-проникающими свойствами и позволял азурину проникать в раковые клетки человека. Кроме того, показано, что более крупный фрагмент p28 (aa 50-77) оказывал влияние на белок p53, связывался с ним и стабилизировал его, вызывая p53-опосредованный апоптоз и противоопухолевый эффект [606]. Этот СРР p28 также обладал антиангиогенными эффектами и прошел клинические испытания на людях [351, 437, 580]. Следует отметить, что клинические исследования по применению СРРs показали несколько их недостатков и ограничений. Установлено, что СРРs были нестабильными и легко расщеплялись протеазами, циркулирующими в плазме крови. Поэтому создание СРРs, устойчивых к протеазам, было первоочередной задачей для устранения этого недостатка [566]. С этой целью СРРs стерически защищали с помощью ПЭГ, прикрепляя его к поверхности с помощью линкера, который затем расщепляли в опухолевой ткани за счет изменения условий окружающей среды и инактивации ПЭГ [263, 272]. Некоторые СРРs использовались для диагностики рака методами молекулярной визуализации, такими как СПЕСТ, ПЭТ и МРТ. Чувствительность таких методов зависит от эффективной доставки контрастных веществ в цитоплазму и/или в ядра ткани-мишени.

Таким образом, ключевой задачей для разработки эффективных методов визуализации опухоли было внедрение СРРs в состав новых контрастных агентов. Нгуен и его сотрудники разработали метод наблюдения за опухолями во время операции, основанный на клеточно-проникающих пептидах, в которых флуоресцентно-меченый АСРР связывали через доступный линкер с нейтрализующим пептидом [382]. Присутствие протеаз, специфичных для опухолевой ткани, позволяло расщеплять линкер, освобождая пептид АСРР, который мог проникать в клетки. На животных моделях было показано, что Cy5-меченый АСРР и АСРРD (Cy5 и gadolinium-

DOTA) позволяли четко определить границы между опухолью и прилегающей тканью, что способствовало превосходной точности резекции [382]. Хирургическое вмешательство, проводимое с помощью АСРРД, позволяло провести предоперационное обнаружение опухоли в теле, интраоперационное наведение с помощью флуоресценции в реальном времени, интраоперационный гистологический анализ состояния опухоли по флуоресценции и послеоперационное количественное определение опухоли с помощью МРТ [382].

### **СРР и специфичная доставка лекарств в органеллы для противоопухолевой терапии**

#### ***Митохондриальная доставка***

Митохондрии представляют собой двигатели клеток и контролируют несколько запрограммированных механизмов гибели клеток. Одним из признаков рака является гипоксическое состояние, которое является смертельным для здоровых клеток. При недостаточном количестве кислорода митохондрии не продуцируют достаточное количество АТФ, опухолевые клетки сверхэкспрессируют индуцируемый гипоксией фактор-1 (HIF-1), и индукция этого фактора усиливает гликолитический путь. Происходит накопление субстратов цикла Кребса, таких как сукцинат. Опухолевые клетки злокачественных образований характеризуются пониженной экспрессией или мутированным белком p53, что позволяет им избежать клеточной гибели, вызванной гипоксией. Мутированный опухоль-супрессорный белок p53 вызывает подавление митохондриального дыхания и усиление гликолиза. Активные формы кислорода вырабатываются в процессе нормальной клеточной функции. Однако дисфункциональная митохондриальная дыхательная цепь производит аномальное количество АФК, которые являются чрезвычайно реактивными и нестабильными. Эта химическая реактивность АФК вызывает перекисное окисление липидов, окисление и деградацию белков, а также повреждение митохондриальной ДНК в виде мутаций, делеций, амплификации генов и перестроек. Митохондриально-опосредованный внутренний путь апоптоза подавляется и может происходить активация онкогенов и инактивация генов-супрессоров (сверхэкспрессия антиапоптотических белков, таких как Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1 и Bcl-w). Эти изменения типичны для опухолевых клеток [56, 65].

Поскольку митохондрии играют эту критическую роль в опосредованной гибели клеток, является перспективным создание противоопухолевых лекарств, нацеленных на митохондрии.

В литературе описан класс синтетических и природных пептидов, так называемых митохондриально-проникающих пептидов, которые могли проникать в клетки и доставлять лекарства в митохондрии [223]. Недавно был получен антиоксидант и митохондриально-проникающий пептид mtCRR-1, который проникал в клетки по независимому энергетическому механизму и локализовался на внутренней митохондриальной мембране. Установлено, что mtCRR-1 был способен доставлять карбоксифлуоресцеин в клетку и преимущественно направлять это соединение в митохондрии. Кроме того, этот пептид уменьшал образование АФК [96, 248, 514]. Мно-

гочисленные исследования, полученные в ходе доклинических и клинических испытаний, четко продемонстрировали способность CPPs увеличивать терапевтический ответ при онкологических заболеваниях. В последнее десятилетие проводились клинические испытания нескольких препаратов на основе CPPs. Например, пептид P28 прошел клинические испытания для лечения p53-положительных прогрессирующих опухолей центральной нервной системы, устойчивых к стандартному лечению. Результаты показали, что p28 подавлял деградацию белка p53, ингибировал клеточный цикл и пролиферацию опухолевых клеток, и при этом был неиммуногенным и хорошо переносился пациентами с рефрактерным заболеванием [235, 263]. Для лечения некоторых типов рака применяется иринотекан, про-лекарство, которое под действием карбоксиластераз печени превращается в активный метаболит SN38 [1,15]. Однако, этот препарат был плохо растворим в воде, поэтому на его основе был разработан новый водорастворимый препарат DTS-108, связанный с высоко заряженным олигопептидом DPV1047 (Vectocell1) [1,15]. Этот препарат DTS-108 успешно прошел доклинические и клинические испытания [1, 15, 132, 492]. В ходе исследований было показано, что противоопухолевая эффективность DTS-108 является дозо-зависимой и превосходит иринотекан по эффективности действия для лечения рака легких человека [1, 15, 356]. Кроме того, DTS-108 прошел I фазу клинического исследования для лечения прогрессирующих/метастатических солидных опухолей [116].

Таким образом, изучение противоопухолевой активности различных пептидов показало, что они проявляют различные механизмы действия, блокирующие рост раковых клеток [15]. Такие механизмы включают ингибирование белок-белковых взаимодействий, ангиогенеза, синтеза белков, ингибирование активности ферментов, блокирование путей передачи сигналов, или экспрессии генов [15]. Под воздействием различных неблагоприятных факторов нормальная клетка может переродиться в раковую, которая характеризуется повышенным уровнем экспрессии рецепторов, белков или ферментов, являющихся молекулярными мишенями опухолевой клетки.

Цель нашего исследования состоит в том, чтобы воздействовать на молекулярную мишень RНАММ/НММR онкорептор и тем самым подавить жизнеспособность раковых клеток на самых ранних стадиях и заблокировать развитие опухоли.

## **1.2. Общая характеристика системы RНАММ/ГК**

В настоящее время известно, что большую роль в возникновении, развитии и прогрессии рака имеет микроокружение вокруг опухолевой клетки, а именно, внеклеточный матрикс [52, 68, 628]. Во время развития рака опухолевые клетки взаимодействуют с окружающей их стромой, создавая среду, похожую на ту, которая обнаруживается при заживлении ран с повышенным воспалением, ангиогенезом и ремоделированием внеклеточного матрикса. Известно, что

раковые клетки и фибробласты способны выделять про-воспалительные хемокины и цитокины, которые в свою очередь рекрутируют и активируют иммунные клетки, включая нейтрофилы и макрофаги [2, 120]. Все вместе опухолевые клетки, фибробласты и воспалительные клетки продуцируют факторы, которые ремоделируют внеклеточный матрикс, приводя к образованию «опухолевой» микросреды, которая поддерживает рост опухоли и способствует злокачественному прогрессию [115, 433, 436, 451]. Внеклеточный матрикс состоит из белков и протеогликанов/гликозаминогликанов, которые обеспечивают структурную поддержку и облегчают организацию тканей. Кроме того, специфические компоненты внутриклеточного матрикса способствуют выживанию, пролиферации, миграции, ангиогенезу и инфильтрации иммунных клеток. Однако, некоторые полисахариды и белки внеклеточного матрикса могут также играть негативную роль в перерождении нормальной клетки в раковую и в дальнейшей прогрессии заболевания [2, 45, 77, 81, 623].

### 1.2.1. Гиалуроновая кислота: структура, свойства и роль в онкогенезе

Основным компонентом внеклеточного матрикса является гиалуроновая кислота (ГК) [229]. Гиалуроновая кислота представляет собой несulfурированный гликозаминогликан, который является основным компонентом соединительной, эпителиальной и нервной тканей, и входит в состав многих биологических жидкостей организма, таких как синовиальная и слезная жидкость, слюна, суставной хрящ [222, 507].

Гиалуроновая кислота представляет собой несulfурированный поли-(2-ацетидамо-2-дезоксид-Д-глюко)-Д-глюкуроногликан, состоящий из повторяющихся остатков Д-глюкуроновой кислоты и Д-N-ацетилглюкозамина (брутто-формула  $C_{28}H_{44}N_2O_{23}$ ) (Рисунок 3).

#### Повторяющийся дисахарид [(1→3)-β-d-GlcNAc-(1→4)-β-d-GlcA].

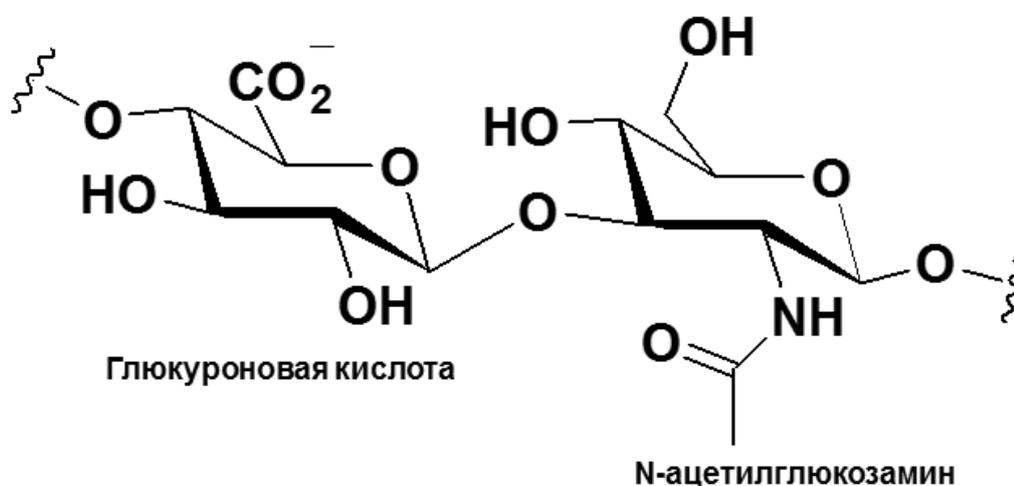
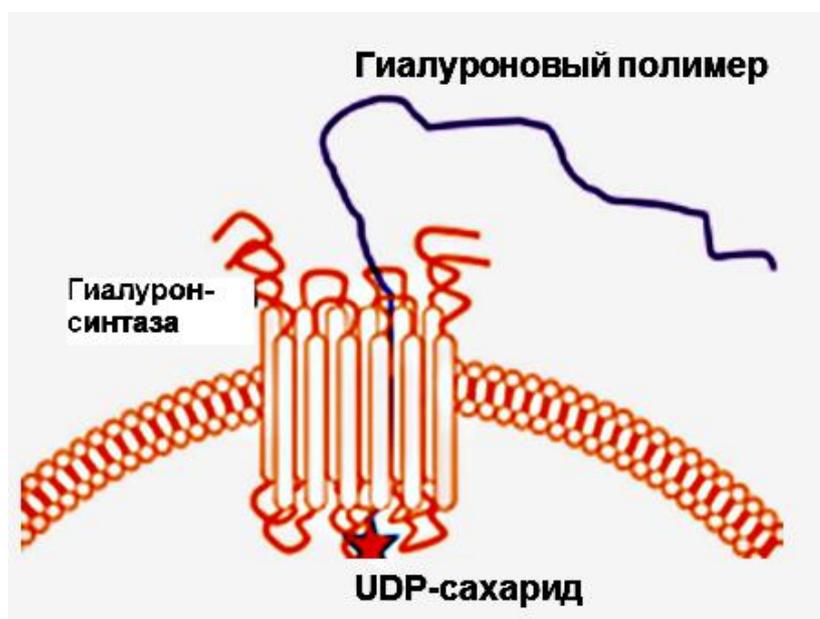


Рисунок 3 – Структура гиалуроновой кислоты. Адаптировано из: Stern R., 2004 [507].

ГК синтезируется на клеточной поверхности в виде большого линейного анионного полимера (до  $10^7$  Да) в различных типах клеток, при заживлении ран, а также в опухолях [389, 519]. Существует три различных изофермента синтазы ГК (HAS1, HAS2, HAS3), которые синтезируют ГК. Эти синтазы ГК являются уникальными гликозилтрансферазами, поскольку они локализируются в цитоплазматической мембране, а не в аппарате Гольджи [519, 584]. Первичная структура всех трех изоформ показывает, что они являются трансмембранными белками и пронизывают цитоплазматическую мембрану несколько раз. Эти три изофермента содержат цитоплазматические каталитические центры, которые синтезируют в результате реакции олигомеризации ГК из UDP-N-глюкуроновой кислоты и UDP-N-ацетил-N-глюкозамина [229, 584]. Образующийся полимер ГК выделяется непосредственно во внеклеточное пространство через поры в плазматической мембране (Рисунок 4).

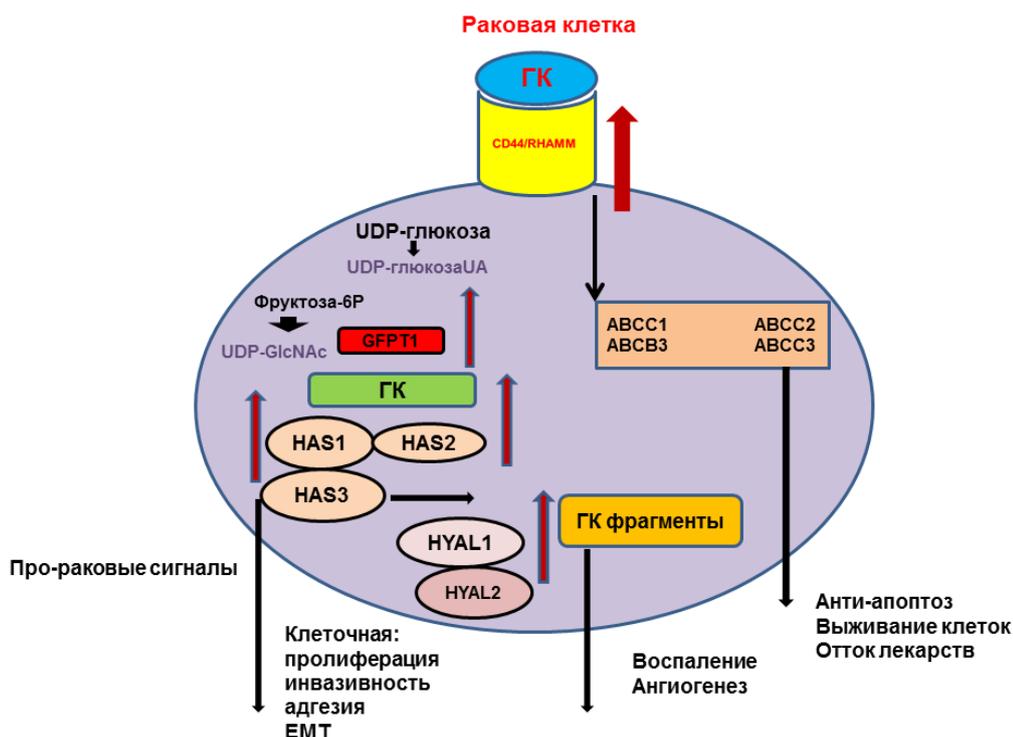


**Рисунок 4** – Синтез ГК в клетке. UDP –сахара связываются с синтазой в цитоплазме и растущий полимер выделяется через поры во внеклеточное пространство. Адаптировано из: McCarthy J. B. and Turley E. A., 2018 [346].

Результаты исследования клеточных культур продемонстрировали, что инвазивные опухолевые клетки рака молочной железы синтезируют и накапливают большее количество ГК, чем нормальные ткани, и преимущественно экспрессируют больше HAS2 mRNA, чем менее агрессивные опухолевые клетки [299]. Кроме того, показано, что HAS2 синтаза способствует инвазии клеток РМЖ *in vitro* [50]. В ходе исследования было выявлено, что повышенный синтез HAS2 синтазы в эпителиальных клетках молочной железы трансгенных мышей MMTV-Neu стимулировал образование ГК в опухоли и индуцировал рост опухолей молочной железы [2, 268]. Такие опухоли с гиперэкспрессией HAS2 демонстрировали высокий уровень ангиогенеза и рекрутирование клеток стромы. Следовательно, результаты этого исследования показали, что

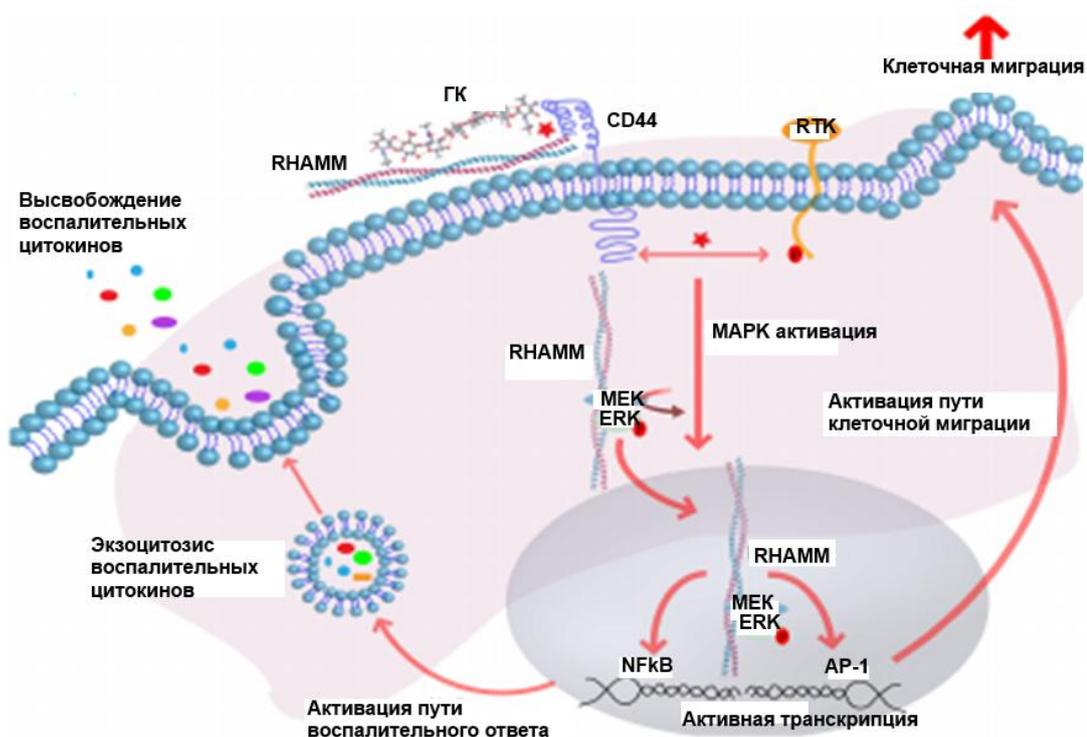
повышенное содержание ГК в микроокружении опухоли запускает механизмы развития и прогрессирования опухоли. В настоящее время известно, что повышенное содержание ГК наблюдается в различных видах опухолей, включая карциномы рака груди, простаты, легких, мочевого пузыря, рака яичников [2, 369, 439, 485, 534]. Ранее было продемонстрировано, что ГК специфически связывается с высоким сродством с интактными клетками и повышает подвижность клеток [2, 552, 545]. Эти результаты показали, что ГК может непосредственно влиять на поведение клеток. Позднее было установлено, что ГК играет важную роль в процессах воспаления, заживления ран, ангиогенеза, жизнеспособности, пролиферации, миграции, метастазирования опухолевых клеток, а также в возникновении и прогрессировании онкологических заболеваний [2, 57, 71, 323, 480, 538, 599].

ГК является физиологическим лигандом и сигнальной молекулой RHAMM рецептора (также известным как CD168 или HMMR, рецептор гиалуронан опосредованной подвижности) [2, 161, 461]. ГК играет важную роль в прогрессировании и прогнозе онкологических заболеваний через RHAMM-опосредованные сигнальные пути. На модельных системах опухолей было показано, что RHAMM рецептор содержит центр связывания ГК, тубулина и особые области, необходимые для проявления его онкогенных свойств [2, 479, 490]. ГК выполняет структурные и сигнальные функции в клетке. ГК проявляет различные эффекты в зависимости от ее молекулярной массы и концентрации [2, 123]. В ряде работ показано, что высокомолекулярная ГК (Мол. масса > 100 кДа) [2] отвечает за структурные функции, образование тканей, в то время как низкомолекулярная ГК (Мол. масса < 100 кДа) активирует сигнальные пути и посылает про-раковые сигналы [2, 14] в клетку, и таким образом контролирует выживание клеток, пролиферацию, воспаление, адгезию, подвижность и инвазивность раковых клеток [2, 14, 361, 463]. Низкомолекулярные фрагменты ГК (< 100 кДа) генерируются активными формами кислорода или азота, а также гиалуронидазами во время тканевого стресса, репарации или раковых заболеваний, и они обладают про-воспалительными и про-опухолевыми свойствами [37, 179, 476, 529, 590, 593]. Показано, что низкомолекулярная ГК ускоряет пролиферацию и инвазивность клеток злокачественной плевральной мезотелиомы и меланомы, и она может быть биомаркером для ранней диагностики этих заболеваний (Рисунок 5) [117, 428, 600].



**Рисунок 5** – Роль низкомолекулярной ГК в онкогенезе. Раковые клетки производят повышенные уровни эндогенной ГК, которая экспортируется из клеток и взаимодействует с рецепторами CD44/RHAMM. Гиалуронидазы (HYAL1, HYAL2) расщепляют ГК на фрагменты, которые способствуют воспалению и ангиогенезу. Низкомолекулярные фрагменты ГК активируют сигнальные пути, которые посылают ряд про-раковых сигналов, способствующих пролиферации клеток, инвазии, адгезии, подвижности, эпителиально-мезенхимальному переходу (EMT) и обновлению стволовых клеток. UDP: уридин дифосфат; HAS: гиалуронсинтаза. HYAL: гиалуронидаза. Адаптировано с модификациями из: Price Z. K., Lokman N. A., Ricciardelli C., 2018 [428].

Гиалуроновая кислота участвует в активации сигнальных путей. Впервые в 1989 году было показано, что ГК стимулирует каскады фосфорилирования тирозина в белках и тем самым влияет на подвижность клеток [204, 544]. Кроме того было обнаружено, что, небольшие количества (нанограммы) ГК активируют различные тирозин и серин/треонин-киназы. Показано, что ГК взаимодействует и индуцирует активность таких белков, как киназа фокальной адгезии, тирозинкиназа Src, рецептор HER2/Neu, MAP1 киназы и протеинкиназа C [2, 69, 70, 203, 311, 629]. Благодаря регулированию активности этих киназ ГК индуцирует экспрессию специфичных цитокинов и белков (AP-1, NFκB-ядерный фактор каппа В), участвующих в ремоделировании внеклеточного матрикса (Рисунок 6) [2, 472].



**Рисунок 6** – Гиалуроновая кислота индуцирует рецептор-опосредованный сигналинг через взаимодействие с клеточно-поверхностными ГК-связывающими белками. Сокращения: MEK, MAPK, ERK-киназы; ERK-экстраклеточно регулируемая киназа; RHAMM-рецептор гиалуронан опосредованной подвижности; CD44-кластер дифференциации 44; AP-1: белок-активатор-1; RTK-рецептор тирозин киназы; NFκB-ядерный фактор каппа В. Адаптировано из: Schwertfeger K. L., Cowman M. K. et al., 2015 [472].

Таким образом, ГК индуцирует рецептор-опосредованные сигнальные пути и вызывает изменения в клеточном трапскриптоме [472].

В ряде работ показано, что в раковых клетках предстательной и молочной желез, мочевого пузыря, легких и яичников [2] наблюдаются повышенные уровни ГК и RHAMM, которые совместно с HYAL-1 гиалуронидазой способствуют росту опухоли и связаны с плохим прогностическим фактором [2, 72, 143, 241, 249, 313, 345, 346, 501]. Исследования, посвященные конкретно гиалуронидазе 1 (Hyal1), показывают, что усиленная экспрессия Hyal1 в клетках рака молочной железы вызывает пролиферацию, миграцию, инвазию и ангиогенез опухолевых клеток [521]. Кроме того, нокаут Hyal1 в клетках рака молочной железы уменьшает рост клеток, адгезию и инвазию клеточной культуры, а также снижает рост опухоли *in vivo* [520]. Повышенные уровни низкомолекулярной ГК могут также ускорять митоз и инвазию клеток в окружающие ткани. Увеличенные уровни низкомолекулярной ГК, обнаруженные в сыворотке пациентов с раком молочной железы, коррелируют с наличием метастазов в лимфатических узлах [598]. Установлено, что ГК индуцирует экспрессию провоспалительных цитокинов IL-1β-макрофагов [392]. Многочисленные исследования выявили инициацию и прогрессирование рака молочной железы под действием цитокина IL-1β. Экспрессия IL-1 повышается в опухолевых и стромаль-

ных клетках в 90% карцином молочной железы [275, 402]. В свою очередь повышенное содержание IL-1 в микроокружении опухоли приводит к усилению экспрессии циклооксигеназы-2 (ЦОГ-2), которая способствует образованию ранних стадий поражения и является хорошо известным опухолевым промотором [387]. Повышенный уровень IL-1 также приводит к росту опухолей молочной железы и метастазированию, частично благодаря индукции регуляции клеток-мишеней, происходящих из миелоидных клеток (MDSC), которые способствуют развитию иммуно-супрессивной среды [84]. Гиалуроновая кислота также контролирует экспрессию хемокинов, включая IL-8 / CXCL8 [349]. Хемокины являются провоспалительными цитокинами, которые играют важную роль в рекрутировании лейкоцитов и в клеточной транспортировке. Эти секретируемые белки взаимодействуют с рецепторами, связанными с G-белком на клеточной поверхности, чтобы вызвать перестройку цитоскелета, адгезию к эндотелиальным клеткам и направленную миграцию клеток в определенные участки ткани [40]. Например, IL-8 связывает свои рецепторы, CXCR1 и CXCR2, чтобы стимулировать хемотаксис нейтрофилов [385]. IL-8 сверх экспрессируется при раке молочной железы и способствует опухолевой инициации и росту посредством стимуляции миграции и инвазии клеток рака молочной железы. Совсем недавно в исследованиях было показано участие IL-8 в регуляции инвазивности клеток РМЖ [1, 487]. Хемокины макрофагов, которые регулируются ГК, включая CXCL2 и CXCL12, аналогичным образом вовлечены в прогрессирование рака молочной железы и способствуют миграции и инвазии этих раковых клеток [59, 174, 236]. Установлено, что CXCL12/CXCR4axis особенно важно для метастазирования опухолевых клеток молочной железы, костного мозга и легких [85]. Эти исследования предполагают, что модуляция провоспалительных цитокинов посредством ГК в микроокружении опухоли представляет собой потенциальный механизм, с помощью которого ГК может способствовать прогрессированию роста опухоли. Эти исследования предполагают про-онкогенную роль повышенного содержания ГК и механизмы, с помощью которых ГК может способствовать инициации и прогрессированию опухоли. Например, увеличение количества ГК в опухолевой клетке может обеспечить им защитную оболочку, сводя к минимуму распознавание иммунными клетками и способствовать снижению повреждений от активных форм кислорода и азота.

Понимание роли, которую играет ГК в развитии и прогрессии рака, имеет важное значение для разработки новых терапевтических подходов, направленных как на опухолевые клетки, так и на про-онкогенные функции раковой стромы. Участие ГК и RHAMM рецептора в сигнальных путях, регулирующих взаимодействия между молекулами в клетке, предполагает их потенциал в качестве биомаркеров для диагностики и терапии онкологических заболеваний. Блокирование синтеза или сигналинга ГК, а также устранение ГК-связывающей функции одно-

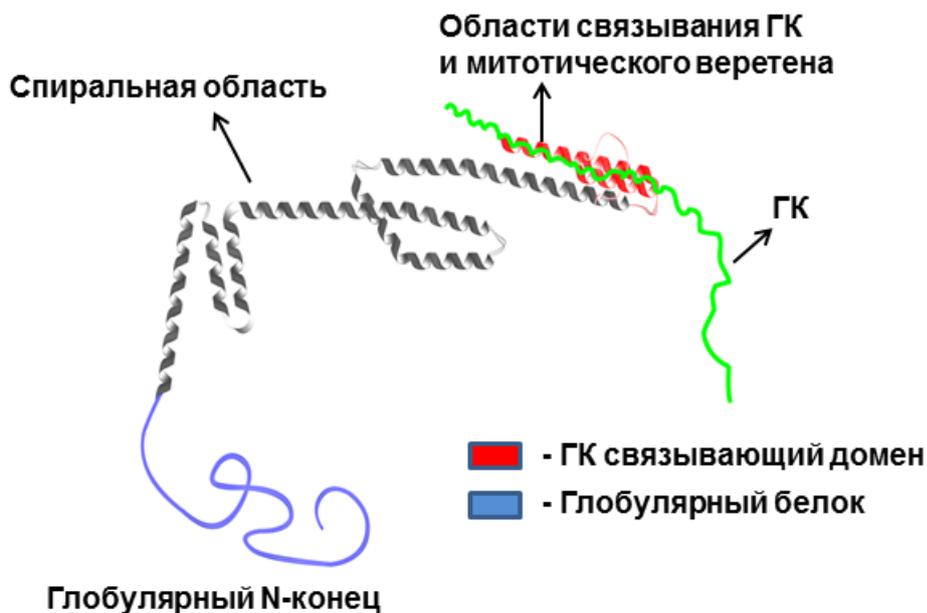
го из ее рецепторов RНАММ, который тесно связан с онкогенезом, является новым многообещающим терапевтическим подходом для лечения онкологических заболеваний.

### ***1.2.2. RНАММ, свойства, структура, область связывания с ГК и тубулином***

В настоящее время известно, что в составе внеклеточного матрикса злокачественных новообразований наблюдается повышенное содержание таких компонентов, как фибриноген, фибронектин, ламинин, коллаген и ГК [388]. Ранее было обнаружено, что в процессе возникновения и прогрессирования рака происходят существенные изменения в механических и структурных свойствах компонентов внеклеточного матрикса [388]. Следует отметить, что повышенное содержание ГК является индикатором прогрессирования рака [388]. Ключевые биологические функции ГК обусловлены ее взаимодействиями со специфическими рецепторами клеточной поверхности CD44 и RНАММ, которые играют важную роль в воспалительных процессах и развитии рака [225, 410, 535].

RНАММ/HMMR (рецептор гиалуронан опосредованной подвижности, *Homo sapiens*) является глобулярным белком, состоящим из 725 аминокислот (Мол. масса – 95 кДа) [221]. RНАММ впервые был идентифицирован и выделен из фибробластов мыши в 1992 г [209]. Показано, что мРНК RНАММ подвергается альтернативному сплайсингу и при этом образуются различные изоформы белка [110, 321]. В настоящее время идентифицированы 4 изоформы RНАММ из опухолевых клеток (А, В, С и Д, Мол. массы 70.02, 75.70, 77.43 и 83.71 kDa) [110, 569]. ГК является физиологическим лигандом RНАММ рецептора.

В зависимости от локализации различают поверхностный и внутриклеточный RНАММ, который локализуется в цитоплазме и в ядре клетки. Структурно RНАММ является гидрофильным, альфа-спиральным белком, не имеет гидрофобного сигнального пептида или гидрофобных трансмембранных доменов (Рисунок 7).



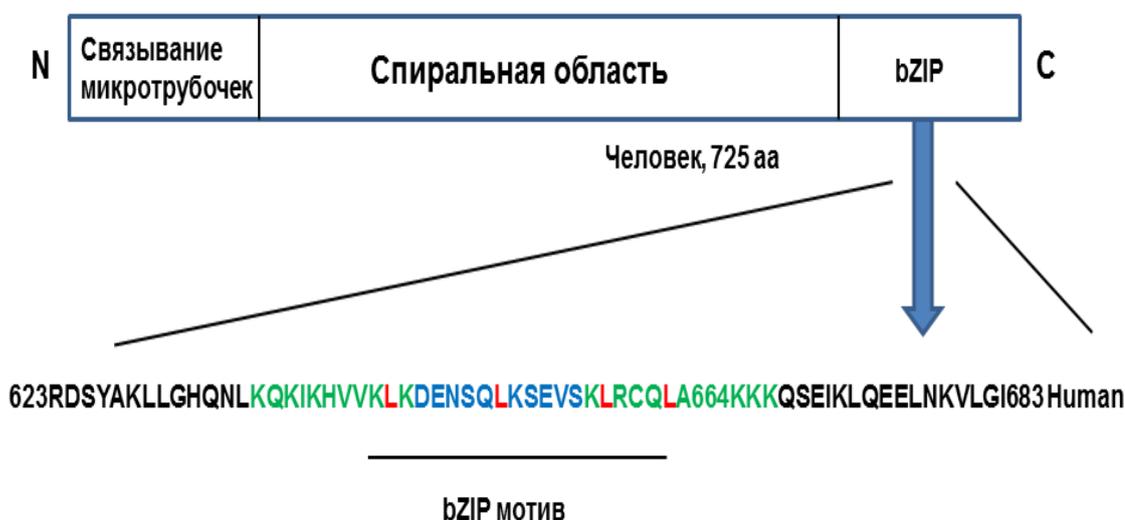
**Рисунок 7** – Структура RHAMM. Адаптировано из: Tolg C., McCarthy J. B., Yazdani A., Turley E. A., 2014 [535].

Фактически, в RHAMM отсутствуют структурные свойства, необходимые для традиционного внеклеточного экспорта. Показано, что RHAMM имеет примерно 35% гомологии с аминокислотной последовательностью белка KIF15, членом семейства кинезинов [506, 634]. Как и KIF15, RHAMM не имеет сигнального пептида для экспорта через аппарат Гольджи, либо через эндоплазматический ретикулум. Однако, несмотря на это, RHAMM может экспортироваться на поверхность клетки с помощью нетрадиционных механизмов, таких как экзоцитоз или примембранный блеббинг [1].

Поэтому RHAMM функционально относится к числу внутриклеточных белков, которые секретируются и высвобождаются с помощью новых, нетрадиционных механизмов экспорта, и которые выполняют различные внеклеточные и внутриклеточные функции [343, 383, 430].

RHAMM содержит высоко консервативную область связывания ГК и митотического веретена (Рисунок 7). Связывание ГК с RHAMM отличается от взаимодействия ГК с CD44. Показано, что связывание ГК с CD44 происходит посредством взаимодействий с N-концевым «связующим» доменом CD44 рецептора, подобным тем, которые были обнаружены в других типах белков, связывающих ГК, в частности, внеклеточных протеогликанов, таких как версикан, агрекан и белок связывания [241]. Однако в отличие от CD44 установлено, что RHAMM взаимодействует с ГК ионным способом через основную аминокислотную C-концевую область, которая может быть подразделена на два мотива из 10 и 11 аминокислот, соответственно [611]. Эти мотивы соответствуют аминокислотам (aa 636–646) и (aa 658–667), которые являются высокоосновными областями (Рисунок 8) [611]. RHAMM связывает ГК через структурный домен  $VX_7V$ , где V представляет собой основной аминокислотный остаток, X представляет собой так-

же основные остатки, который отличается от доменов связывания CD44 [214, 611]. Установлено, что эти основные остатки в RНАММ необходимы для ионного взаимодействия с ГК, а также с гепарином, и эти взаимодействия разрушаются при увеличении концентрации соли [609]. Важно подчеркнуть, что “X<sub>7</sub>” остатки являются высокоупорядоченными и эволюционно консервативными. Этот домен содержит остатки лейцина через каждые 7 аминокислотных остатков и консервативные гидрофобные (внутренние) и полярные (внешние) аминокислотные остатки, которые обеспечивают предсказанную спиральную структуру и образуют основной мотив лейциновой застежки-молнии (zipper, bZip) (Рисунок 8).



**Рисунок 8** – Консервативные структурные домены в RНАММ: N-концевой домен, связывающий микротрубочки, отделен от C-концевого основного мотива лейциновой молнии (bZIP) с помощью большого спирального домена. C-терминал направляет белок в центросому и регулирует убиквитинирование. Основные мотивы в RНАММ, которые взаимодействуют с гиалуроновой ксилотой, обозначены зеленым цветом. Консервативные лейцины обозначены красным цветом для мотива bZIP, который подчеркнут черным. Адаптировано с модификациями из: He Z., Mei L., Connell M., Maxwell C. A., 2020 [214].

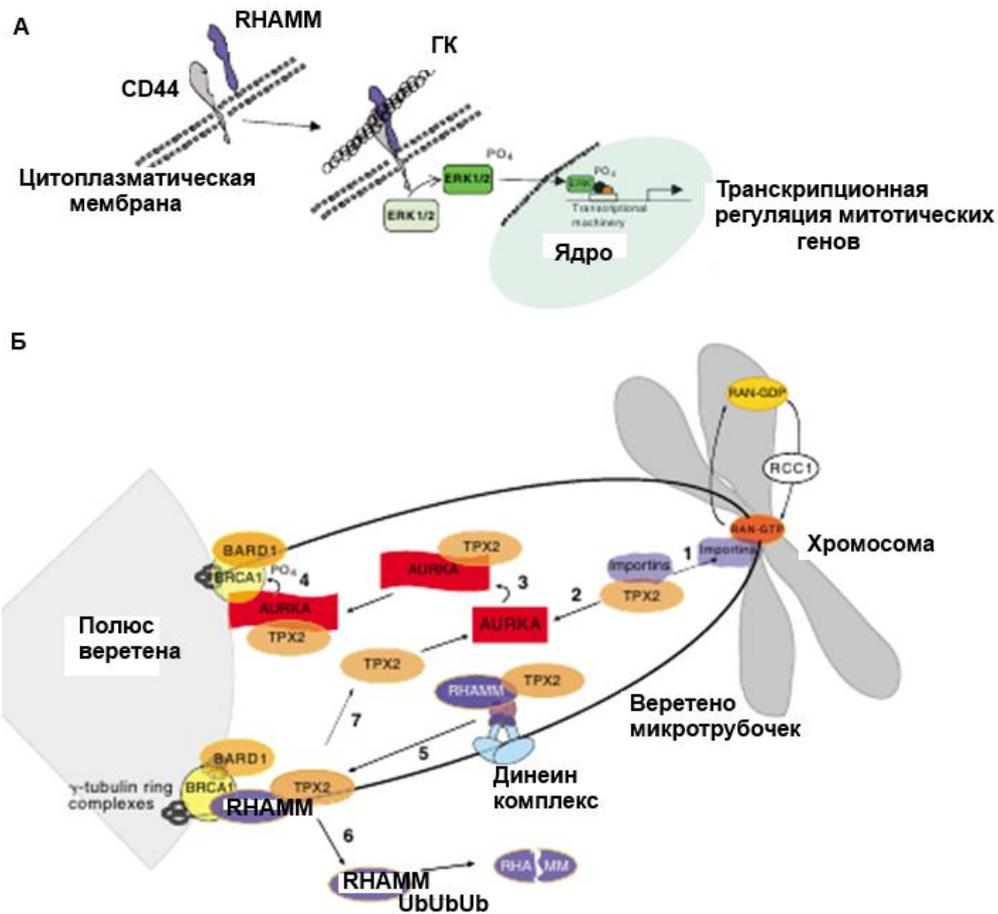
Следует отметить, что этот мотив bZip сохраняется во всех хордовых, в том числе у морского кальмара (*Ciona intestinalis*), а также у насекомых [122]. Показано, что лейциновая застежка-молния необходима также для ассоциации RНАММ с митотическим веретеном [35, 214].

Внутриклеточный RНАММ представляет собой ядерный белок, который связывается с тубулином митотического веретена, а также с моторными белками, такими как динеин [34, 35]. RНАММ играет ключевую роль в формировании митотического веретена, а также в регуляции правильной хромосомной сегрегации и геномной стабильности [609, 611]. Установлено, что сверхэкспрессия RНАММ, также как и его отсутствие приводят к деформации митотического веретена [340]. Эти эффекты RНАММ являются следствием его стыковки с MEK1 / ERK1,2, поскольку повреждения митотического веретена, возникающие в результате потери экспрессии RНАММ, могут быть восстановлены заново активностью MEK1 [531].

Исследования показали, что RНАММ содержит на N-конце домены, связывающие  $\alpha$ -тубулин микротрубочек в период интерфазы митоза клеток (Рисунок 7, 8) [83, 340, 341, 504]. Распределение RНАММ наблюдалось по всей длине микротрубочек, что было ранее показано также для других белков, ассоциированных с эпителиальными микротрубочками (МАР), включая МАР4 и МАР125 [98, 154]. Совместная локализация RНАММ с тубулином микротрубочек наблюдалась во всех исследованных типах клеток, что убедительно свидетельствует о том, что RНАММ представляет новый член семейства белков МАР. Результаты исследований показали, что гомология RНАММ с МАР белками наблюдается полностью в спиральных доменах [98, 154]. Известно, что тубулин-связывающие домены обычно ограничены основными областями, содержащими повторяющиеся мотивы, богатые заряженными аминокислотами. Установлено, что домен взаимодействия RНАММ с тубулином состоит из двух отдельных субдоменов, МТВД-1 и МТВД-2 [611]. Показано, что МТВД-1 включает в себя последовательности из аминокислот aa 40-59. Эта область RНАММ является основной (pI 10.61), высоко заряженной (45% заряженных остатков) и богатой аминокислотой пролином. МТВД-2 включает последовательности аминокислот aa 76-90 [611]. МТВД-2 является нейтрально заряженной областью и вносит вклад в связывание тубулина посредством пространственной кластеризации положительно заряженных остатков  $\alpha$ -спирального сегмента RНАММ [83, 98]. Установлено также, что область связывания RНАММ с тубулином перекрывается с областью связывания ГК [611].

Внеклеточный и внутриклеточный RНАММ имеет разнообразные функции и способен взаимодействовать с различными белками (Рисунок 9).

Структурно центральная область RНАММ представляет собой спиральный виток (aa 69–681), который действует в качестве домена потенциальной димеризации и области связывания для других белков. Установлено, что RНАММ взаимодействует с СНСА / FАМ83D через аминокислотную последовательность aa365–546, а аминокислотная последовательность aa574–602 работает как домен для связывания кальмодулина [35, 154, 178]. Благодаря своему взаимодействию с СНСА, RНАММ локализует легкую цепь динеина 1 (DYNLL1) и альфа-СК1 в веретено, а также способствует стыковке ВАСН1 в веретене [154, 298]. Эти белковые комплексы, образующиеся при взаимодействии с RНАММ, играют ключевую роль в правильной ориентации митотического веретена и установлении оси деления клетки. Показано, что фосфорилированная по тирозину форма RНАММ-Thr703 также локализуется в ядре [112, 298]. RНАММ посттрансляционно модифицируется особенно во время G2M и поляризации клеток во время миграции [484].



**Рисунок 9** – Внеклеточные и внутриклеточные функции RHAMM. (А) RHAMM на клеточной поверхности способствует активации сигнальных каскадов. RHAMM на клеточной поверхности связывается с CD44 и в присутствии ГК активирует ERK1/2 (обозначен как фосфорилированный (PO<sub>4</sub>) ERK1/2), что приводит к экспрессии генов, необходимых для подвижности и инвазии. (Б) В экстрактах из яиц *X. laevis* градиент RAN-GTP, который определяется активностью связывающего хромосому гуанинового нуклеотид-фактора RCC1, необходим для сборки анастрального митотического веретена. Активность RAN-GTP регулирует функцию ряда белков митотического веретена, включая импортины, которые затем образуют ингибирующие комплексы с обоими факторами сборки веретена и TPX2. Например, связывая импортины (обозначенные, как стадия 1), RAN-GTP высвобождает TPX2 (стадия 2), который является основным активатором *Аврора киназы А* (AURKA). TPX2 напрямую активирует AURKA путем защиты аутофосфорилированного остатка (стадия 3). AURKA, в свою очередь, может фосфорилировать (PO<sub>4</sub>) BRCA1 для облегчения перехода G2-М (стадия 4). Посредством взаимодействия с комплексом динеина RHAMM локализуется на полюсе веретена, на котором он взаимодействует с  $\gamma$ -тубулином (стадия 5). RHAMM также взаимодействует с TPX2 и динеином, тем самым обладая потенциалом локализовать TPX2 на полюсе веретена (стадия 5). Комплекс BRCA1-BARD1 модифицирует локализацию TPX2 и сборку веретена, ослабляя функцию RHAMM посредством убиквитинирования (Ub) (стадия 6). Убиквитинирование RHAMM, и впоследствии его деградация, вероятно, высвобождает TPX2 из полюса веретена (стадия 7), что влияет на активацию AURKA и прогрессию G2-М. Адаптировано из: Maxwelll С. А, McCarthy J., Turley E., 2008 [343].

Киназы, осуществляющие фосфорилирование RHAMM, включают Src, PKC, ERK1/2 и AURKA (Рисунок 8). Фосфорилированная форма RHAMM-Thr703 не только направляет белок в ядро, но также регулирует Ran-зависимый ядерный транспорт белка-мишени TPX2 [112, 394]. TPX2 в настоящее время подробно охарактеризован, как основной активатор митотической ки-

назы *Aurora kinase A*, а также выполняет и другие функции [60, 184, 594]. Для RHAMM характерно образование комплексов с белком TPX2 в зависимости от фазы клеточного цикла [102, 197]. Эти комплексы служат как для регуляции активности митотической киназы, так и для регуляции белка Eg5, отвечающего за подвижность клеток [101, 158, 473].

Таким образом, RHAMM служит связующим партнером для белков сборки митотического веретена, таких как TPX2, DYNLL1, CNICA и FAM83D, а также для регулирования его сборки, стабильности и правильного расположения микротрубочек веретена во время митоза.

#### **Функции RHAMM и CD44 в гомеостазе и митозе клетки**

В то время как экспрессия CD44 является повсеместной, RHAMM обычно не обнаруживается в большинстве гомеостатических тканей, но его экспрессия увеличивается в ответ на повреждение ткани, клетки и, таким образом, оказывается в первую очередь важной для восстановления гомеостаза после повреждения ткани или клетки [535]. Нокаут RHAMM<sup>(-/-)</sup> мыши являются жизнеспособными, но обнаруживают дефекты тканей, включая повреждение сосудов и заживление ран [532]. RHAMM является также необходимым для фертильности взрослых самок мышей [297].

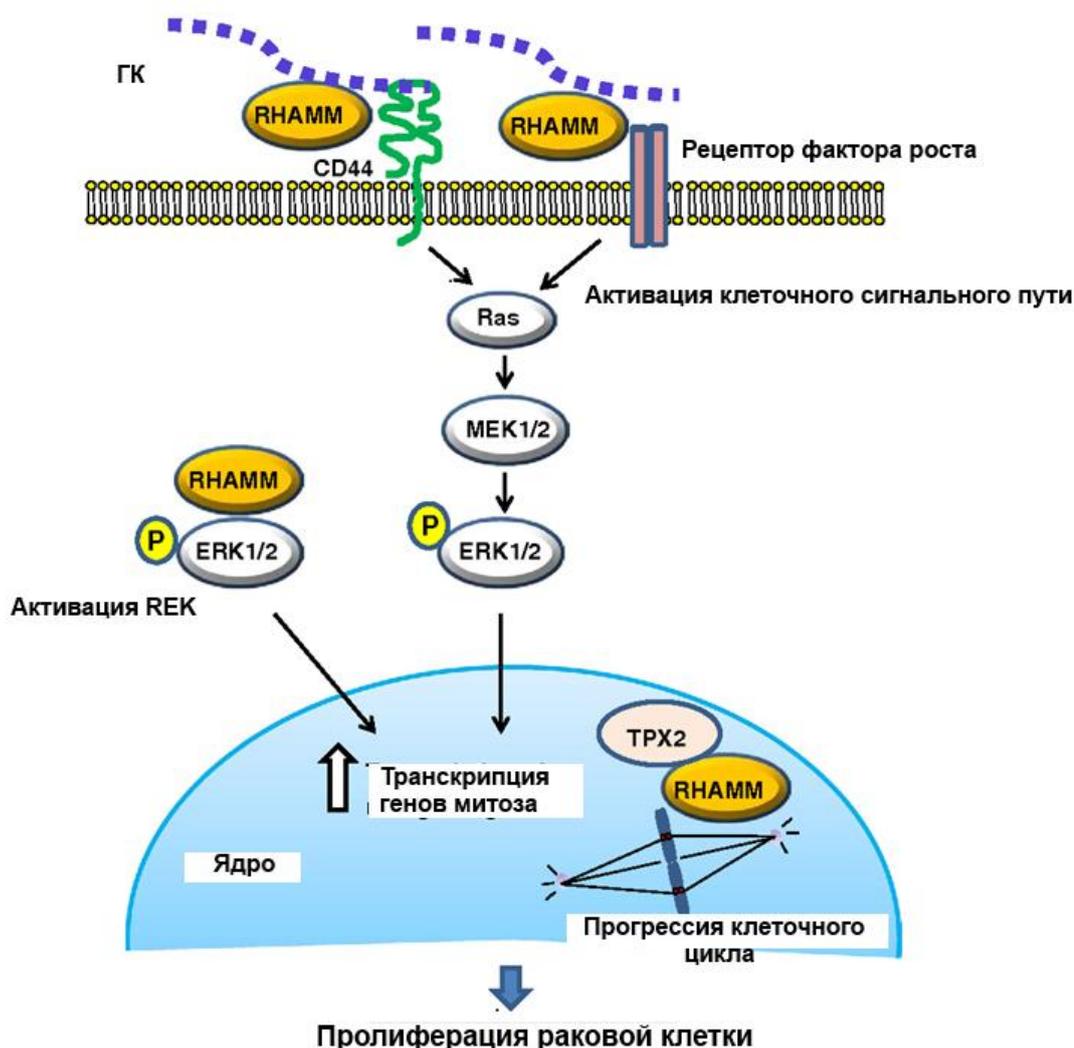
В ряде работ было показано, что взаимодействие ГК с CD44 часто ассоциируется с повышенной подвижностью клеток и инвазивностью, а также CD44 может влиять на рост и лекарственную устойчивость опухолевых клеток [277, 539]. Как и в случае с CD44, RHAMM может находиться на поверхности клеток. Однако, в отличие от CD44, экспрессия поверхностного RHAMM строго регулируется, это происходит только в условиях клеточного стресса. Таким образом, RHAMM является в значительной степени цитоплазматическим белком, локализация поверхностного RHAMM белка строго регулируется механизмами, сходными для других неконвенционально экспортируемых цитоплазматических и ядерных белков. Поверхностный RHAMM регулирует активацию сигнального каскада посредством взаимодействия с другими интегральными рецепторами, такими как CD44 [535]. Кроме того, поверхностный и внутриклеточный RHAMM также участвуют в стимулировании клеточной подвижности и инвазии. Показано, что подвижность клеток зависит от внеклеточных взаимодействий RHAMM и CD44, поскольку дефекты подвижности, проявляемые клетками RHAMM<sup>(-/-)</sup>, устраняются в течение 4 часов путем добавления рекомбинантного белка RHAMM [361, 479].

RHAMM также участвует в регуляции клеточного цикла, поскольку его экспрессия увеличивается в фазе G2/M клеточного цикла [105, 364].

Как и предсказывалось из-за способности RHAMM контролировать экспрессию генов клеточного цикла, RHAMM также может влиять на пролиферацию клеток, а блокирование поверхностного RHAMM или RHAMM в митотическом веретене приводит к блокированию фазы G2/M клеточного цикла [23, 499].

## Сигнальные свойства RHAMM

Поверхностный RHAMM взаимодействует с CD44 и другими интегральными рецепторами, такими как RON, членом семейства рецепторов HGF, и PDGFR для активации сигнальных каскадов, в частности RAS-ERK1/2, которые контролируют экспрессию генов клеточного цикла, таких как *cdk1/cdc2*, и генов, связанных с подвижностью клеток, таких как активация генов металлопротеиназы MMP9 [332, 361, 502, 574]. Как CD44, так и поверхностный RHAMM также функционируют в качестве ко-рецепторов для активации трансмембранных тирозинкиназ (включая EGFR, MEK1/2 и PDGFR) и ERK1/2 (Рисунок 10) [48, 151, 207, 210].



**Рисунок 10** – Роль RHAMM в пролиферации опухолевых клеток. В присутствии ГК внеклеточный RHAMM связывает ГК и взаимодействует с CD44 или рецептором фактора роста, таким как PDGF и EGFR, что приводит к активации Ras, MEK1/2, сигнального пути ERK1/2 и к транскрипции генов митоза. Внутриклеточный RHAMM может активировать ERK, что приводит к индуцированной транскрипции гена, необходимого для пролиферации раковой клетки. Ядерный RHAMM участвует в сборке митотического веретена, связываясь с TPX2. Комплекс RHAMM/TPX2 способствует аномальному прогрессированию клеточного цикла при злокачественном состоянии. Адаптировано с модификациями из: Shigeishi H., Higashikawa K., Takechi M., 2014 [482].

Оба CD44 и RHAMM регулируют интенсивность и длительность действия таких путей передачи сигнала, как ERK1/2, которые инициируются факторами роста [207, 297]. Внутриклеточный RHAMM функционирует в качестве каркасного белка, который непосредственно связывается с ERK1 и образует комплексы с ERK1/2 и MEK1 [531]. RHAMM необходим как для удержания активного ERK1/2 в ядре клетки, так и для экспрессии множества генов, регулируемых ERK1/2 через сигналинг YAP белка [404, 448].

Предполагается, что это один из механизмов, с помощью которого RHAMM помогает увеличить интенсивность и продолжительность онкогенных сигнальных путей ERK1/2 [388, 182]. Одним из следствий ГК, CD44 и RHAMM-опосредованного увеличения продолжительности активации ERK 1/2 является изменение транскриптома клеток в опухолевой строме (Рисунок 10). Эти изменения в экспрессии генов оказывают влияние на активацию путей трансдукции, связанных с миграцией клеток, экспрессией и экспортом медиаторов воспаления [207, 335].

В свою очередь, постоянная активация этих путей в опухолевой строме усиливает про-онкогенное воспаление и прогрессирование опухолей рака молочной железы. Таким образом, это представляет собой один из основных механизмов, с помощью которых биологическая «информация», закодированная в ГК, может привести к про-онкогенным или «раковым» изменениям в строме. Позитивные паракринные и аутокринные петли обратной связи между опухолевыми и стромальными клетками могут инициироваться медиаторами воспаления, такими как IL-1 $\alpha$  и TGF $\beta$ , которые увеличивают синтез ГК и экспрессию обоих RHAMM и CD44, которые в совокупности поддерживают миграцию и инвазию клеток в раковой строме [404, 617].

Таким образом, ненормальная регуляция CD44 или RHAMM в раковой строме является очевидным следствием устойчивой активации ERK 1/2, что способствует сохранению устойчивой онкогенной передачи сигналов [150, 211, 265]. Поскольку CD44 и RHAMM функционально взаимодействуют при определенных условиях, таргетинг RHAMM может быть эффективным способом специфического ограничения функции CD44 в опухолях молочной железы.

Существуют также и другие рецепторы, участвующие в клеточных ответах на ГК, TLR2, TLR4 и LIVE-1 [41, 169, 300, 327, 432]. Однако роль этих рецепторов в онкогенезе пока недостаточно изучена.

### **1.3. ГК и RHAMM - мишени для терапии онкологических заболеваний**

#### ***1.3.1. Таргетинг ГК***

ГК выполняет разнообразные функции в микроокружении опухоли (Таблица 2).

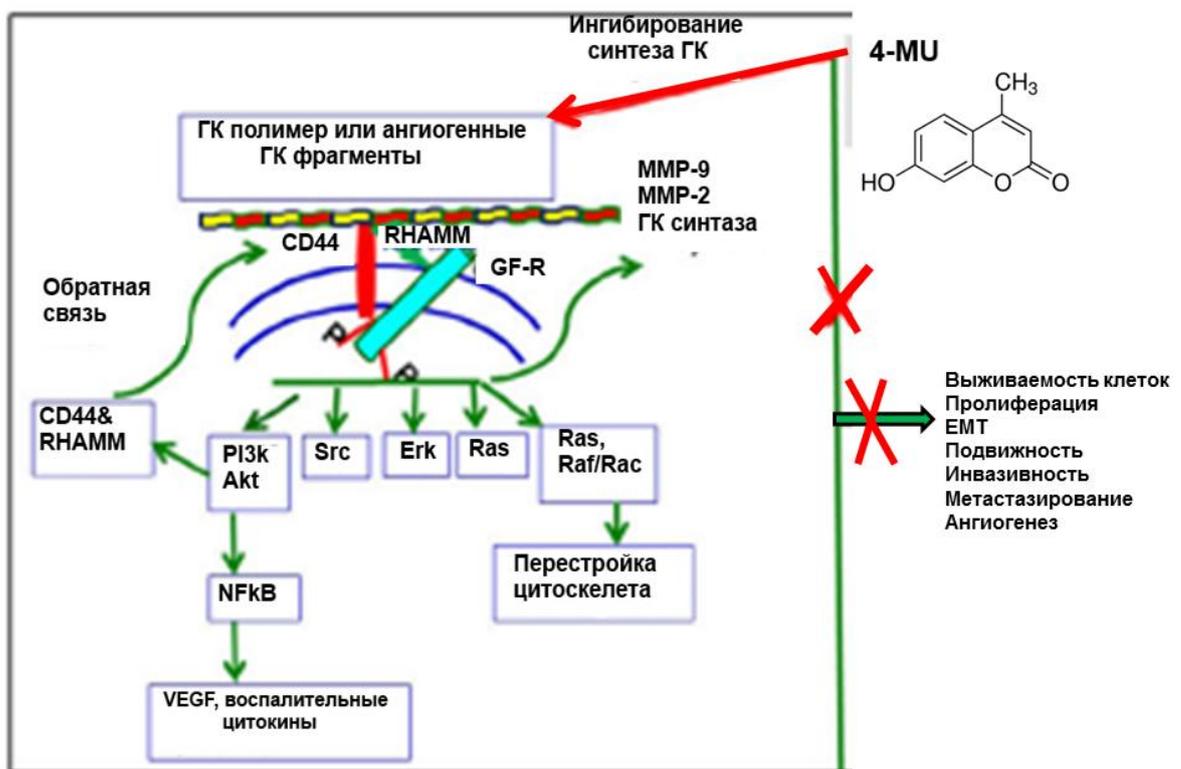
**Таблица 2** – Эффекты ГК на опухолевые клетки. Адаптировано с модификациями из Price Z. K., 2018 [428].

Типы клеток	ГК (кДа)	Функциональная роль и эффекты ГК
<i>Рак яичников</i>		
SKOV-3	1000	ГК способствует миграции и росту клеток через Rac1 и Ras
SKOV-3	500	ГК способствует миграции клеток через CDC42 и ERK1
<i>Рак молочной железы</i>		
MDA-MB-231	400–500	ГК способствует росту клеток и инвазивности через RhoA, RhoC и ROK
MCF-7	500	ГК стимулирует экспрессию MDR1 и Vcl-x <sub>L</sub> , рост клеток и инвазивность
MDA-MB-231	3–5	ГК ускоряет инвазивность клеток
<i>Хориокарцинома</i>		
JEG-3	1500–1800	ГК способствует миграции клеток через RHAMM, PI3K и MAPK
<i>Примечание.</i> Rac1: Ras-родственный GTP-белок; Cdc42: контрольный белок клеточного деления 42; ERK: внеклеточно сигнально регулируемая киназа; PI3K: фосфоинозитид-3-киназа; RhoC: семейство генов Ras гомологов, член C; RhoA: Ras гомолог семейства генов, член A; ROK: Rho-ассоциированная протеинкиназа; RHAMM: рецептор гиалурон-опосредованной подвижности; MAPK: митоген-активированная протеинкиназа		

ГК обеспечивает не только клеточную поддержку и гидрофильный матрикс, но также регулирует межклеточную адгезию, миграцию, рост и дифференцировку клеток [55, 346]. Кроме того, формируя межклеточные покрытия, ГК может защищать опухолевые клетки от иммунной атаки [180, 185]. Некоторые опухолевые клетки продуцируют повышенное количество ГК или индуцируют выработку ГК путем высвобождения факторов роста и цитокинов. Эти соединения могут регулировать активность ферментов гиалуронсинтазы и гиалуронидазы. Установлено, что сверхэкспрессия ГК повышает способность фибросаркомы и клеток меланомы к образованию метастаз, в то время как прекращение синтеза HAS2 блокирует рост опухоли простаты мышинных ксенографтов [308, 486]. В опухоли также может происходить накопление низкомолекулярной ГК за счет АФК-индуцированной фрагментации ГК [508]. В результате этого низкомолекулярная ГК накапливается в паренхиме опухоли и в стромальных тканях, что способствует метастазированию раковых клеток [218, 307, 547, 627]. Кроме того, сверхэкспрессия ГК в опухолевых клетках может индуцировать эпителиальные изменения раковых клеток в направлении миграционного фибробластического фенотипа [230]. ГК может также привлекать мезенхимальные стволовые клетки, которые являются предшественниками фибробластов, ассоциированных с опухолью [635].

Модели на трансгенных мышах показали, что ГК активирует ангиогенез и рост опухоли [587, 635]. Таким образом, учитывая взаимодействие ГК с RHAMM рецептором и его роль в

развитии и прогрессировании злокачественных новообразований, таргетинг ГК представляет собой перспективный терапевтический подход к лечению онкологических заболеваний. Существует множество потенциальных точек метаболического пути ГК, которые могут быть мишенями, включая синтез ГК, сверхэкспрессию, образование низкомолекулярной ГК или взаимодействие ГК с рецепторами. В настоящее время общепринятым подходом является применение 4-MU (4-methylumbelliferone), ингибитора синтеза ГК, для лечения рака молочной железы (Рисунок 11) [376]. Многочисленные исследования показали, что 4-MU уменьшает пролиферацию, миграцию опухолевых клеток рака молочной железы и снижает рост опухоли у мышей [58, 274, 312, 421, 458]. Кроме того, было показано, что обработка мышей с метастатическими поражениями костей с 4-MU снижала накопление ГК и рост остеолитических поражений [395, 553].



**Рисунок 11** – Молекулярная основа противоопухолевой активности 4-MU. Адаптировано из Nagy N. et al., 2015 [376].

Связывание ГК с клеточно-поверхностными рецепторами, CD44 и RHAMM, запускает различные сигнальные события, включая сложные взаимодействия между рецепторами ГК и рецептором ростового фактора тирозинкиназ, и активацию нижестоящих эффекторов, таких как Akt, NFκB, src, Erk, Ras/Raf/Rac-1. Эти сигнальные события вызывают экспрессию воспалительных цитокинов, VEGF, матриксных металлопротеиназ (MMP-2, MMP-9), а также ГК-синтез и CD44/RHAMM. Индуцируя эти сигнальные события и влияя на эффекторы, ГК стимулирует выживание клеток, пролиферацию, эпителиально-мезенхимальное взаимодействие, инвазию и подвижность, что приводит к росту и прогрессированию опухоли. Поскольку 4-MU ингибирует

синтез ГК, он блокирует первую стадию в этом сигнальном каскаде и, таким образом, проявляет высокую противоопухолевую и антиметастатическую активность. Установлено, что 4-МУ хорошо переносился животными, что свидетельствует о том, что блокирование каталитической функции гиалуронсинтазы представляет собой перспективную терапевтическую стратегию. Недавно также было продемонстрировано, что снижение синтеза ГК в сочетании с химиотерапией усиливает терапевтический ответ лекарства [58]. Важно подчеркнуть необходимость комбинационного таргетинга, воздействующего как на онкогенные сигнальные пути опухолевых клеток, так и на микроокружение опухоли. В связи с этим элиминация ГК в микроокружении опухоли с использованием гиалуронидаз также была исследована в качестве потенциальной терапевтической стратегии для некоторых раковых заболеваний, в частности для рака предстательной и молочной железы [231, 314, 429, 588]. Установлено, что обработка клеток рака молочной железы гиалуронидазой бактериофага ингибировала рост, миграцию и инвазивность клеточной культуры [283]. Показано также, что рекомбинантная гиалуронидаза, которая устраняет стромальную ГК, позволяет увеличить доступ лекарств к опухолевым клеткам [231, 429, 588]. Становится все более очевидным, что будущие перспективы лечения воспаления/рака должны включать таргетинг специфичных сигнальных путей в опухолевых клетках.

Одним из таких подходов является разработка ГК-связывающих пептидов, которые могут специфично блокировать ГК-стимулированную передачу сигналов. Первые попытки в этом направлении привели к созданию пептида PEP-1, который был идентифицирован методом последовательного связывания 12-мерного фагового дисплея с иммобилизованной ГК [372]. Было показано, что PEP-1 уменьшал пролиферацию стволовых клеток желудка и понижал *H. pylori*-индуцированную эпителиальную пролиферацию желудка *in vivo* [253]. Кроме того, PEP-1 в сочетании с селективной активацией рецептора аденозина A2 ингибировал воспаление, связанное с артритом [91, 92]. PEP-1 пептид также уменьшал метастазирование опухоли и повышал выживаемость мышей [373]. Хотя PEP-1 был эффективным в этих исследованиях, не было продемонстрировано, что он ингибирует взаимодействия ГК со специфичным рецептором. Совсем недавно был разработан уникальный пептид RНАММ-миметик (P-15), используя 15-мерный подход фагового дисплея [533]. Этот пептид P-15, который связывается с ГК, является уникальным в нескольких отношениях. По сравнению с пептидом PEP-1 в состав пептида P-15 входит VХ<sub>7</sub>V мотив для связывания с ГК, ранее обнаруженный в RНАММ [15, 16, 533]. Кроме того, этот пептид P-15 способен связываться с низкомолекулярными фрагментами ГК с высоким сродством, и также он может ингибировать связывание ГК с RНАММ, но не блокирует взаимодействие ГК с CD44 [15, 16, 533]. В ходе исследования было обнаружено, что пептид P-15 ингибировал миграцию фибробластов RНАММ<sup>(+/+)</sup>, однако, не влиял на подвижность нокаут фибробластов RНАММ<sup>(-/-)</sup> [533]. Кроме того, было установлено, что P-15 уменьшал воспаление, ангиоге-

нез и фиброплазию клеток RНАММ<sup>(+/+)</sup>, но не RНАММ<sup>(-/-)</sup> клеток. Необходимо отметить, что разработки ГК-связывающихся пептидов продолжаются, и недавно был разработан новый пептид ВН-Р, состоящий из 42 аминокислот, который содержит три ГК-связывающих ВХ<sub>7</sub>В мотива и проявляет противоопухолевые эффекты, в частности, ингибирует пролиферацию опухолевых клеток и рост опухоли меланомы у мышей ксенографтов [605].

### 1.3.2. Таргетинг RНАММ для лечения раковых заболеваний

#### RНАММ-пептиды, используемые в качестве вакцин

RНАММ играет ключевую роль при воспалительных и онкологических заболеваниях. Показано, что RНАММ вовлечен в диабет, артрит и многие виды рака, включая солидные опухоли и лейкемии [237, 595]. RНАММ рецептор избыточно экспрессируется при различных онкологических заболеваниях, включая рак молочной, предстательной и поджелудочной железы, рак почек, рак яичников, мочевого пузыря, лейкемии, множественной миеломы, лимфомы и толстой кишки (Таблица 3) [15, 16, 88, 108, 202, 240, 250, 259, 295, 489, 496].

**Таблица 3** – Экспрессия RНАММ в различных типах опухолей. Адаптировано с модификациями из: Shigeishi H. et al., 2014 [482].

Тип рака	Корреляция между RНАММ и клинико-патологическими параметрами	Методы анализа
Рак головы и шеи	У пациентов с высокой экспрессией мРНК RНАММ ниже показатели выживания. Экспрессия RНАММ коррелировала с экспрессией TPX2	ПЦР или иммунохимия ПЦР
Рак молочной железы	Высокая цитоплазматическая экспрессия RНАММ была обнаружена в инвазивных раковых клетках. Высокая экспрессия RНАММ коррелировала с мутацией в BRCA1	Иммунохимия
Рак предстательной железы	Повышенная экспрессия RНАММ способствует устойчивости андрогенно-депривационной терапии при раке предстательной железы	Иммунохимия
Рак эндометрия	Повышенная экспрессия RНАММ значительно коррелировала с появлением метастаз лимфатического узла	Иммунохимия
Рак почки	Экспрессия мРНК RНАММ коррелировала с метастазированием опухоли	ПЦР
Рак мочевого пузыря	Экспрессия RНАММ коррелировала с инвазивностью опухолей и низкой выживаемостью	Иммунохимия
Лейкемия	Высокая экспрессия RНАММ связана с низкой выживаемостью	Иммунохимия

Известно, что ГК-связывающие функции RНАММ определяют его роль в прогрессировании раковых заболеваний, поскольку накопление и фрагментация ГК также необходимы для этих процессов [269, 357]. Поэтому были разработаны пептиды, которые имитируют либо сам RНАММ, либо ГК, и было показано, что они влияют на заживление ран, воспалительные и опухолевые процессы (Таблица 4).

**Таблица 4** – Таргетинг RНАММ для лечения онкологических заболеваний. Адаптировано из: Misra S. et al., 2015 [361].

<i>Типы рака</i>	<i>Функция RНАММ в развитии рака</i>	<i>Применение ГК-связывающего пептида</i>
Плоскоклеточный рак пищевода	Инвазивность	Рер-1
Множественная миелома и синдром миелодисплазии	Анти-апоптоз	RНАММ-R3-пептиды
Злокачественные опухоли периферических нервных оболочек или множественная миелома	Апоптотическая устойчивость	Блокирование RНАММ
Опухоли нейробластомы	Апоптотическая устойчивость	RНАММ-иммунотерапия, таргетинг AURKA и BARD1
Острый миелоидный лейкоз	Противоопухолевая активность	RНАММ-R3-пептид

В то время как большинство белков, экспрессируемых нормальными тканями, не являются антигенными и не вызывают иммунного ответа из-за «самостоятельной толерантности», давно известно, что опухоли продуцируют антигенные белки, и они классифицируются как антигены, ассоциированные с опухолью (ТАА) [530]. Это часто белковые продукты мутантных генов и онкогенных вирусов, но они также могут быть белками, которые либо вырабатываются в очень небольших количествах, либо имеют ограниченные профили экспрессии в нормальных тканях. Поскольку их воздействие на иммунную систему ограничено, они обычно не вызывают иммунный ответ. Однако экспрессия ТАА резко увеличивается в опухолевых клетках, и это увеличение вызывает иммунный ответ. Таким образом, ТАА являются важными мишенями для иммунотерапии при некоторых видах рака. RНАММ является примером такого высокоантигенного белка с ограниченной экспрессией в нормальных тканях [54]. Первые попытки классификации ТАА использовали методы клонирования цитотоксичных Т-лимфоцитов [459, 583]. Позднее был проведен серологический скрининг библиотек экспрессии кДНК (SEREX), что привело к увеличению количества белков ТАА, связанных как с солидными опухолями, так и с гемопэтическими опухолями (то есть опухолями, развившимися из клеток кроветворной системы, лейкемия, лейкоз и др.) [286, 576]. Скрининг SEREX идентифицировал RНАММ как потенциальный антиген, ассоциированный с лейкемией при остром миелолейкозе и хроническом миелоидном лейкозе, и в таких солидных опухолях как рак молочной железы, яичников, почек, меланомы и в других видах рака [49, 195]. Высокая экспрессия RНАММ связана с агрессивным протеканием многих раковых заболеваний, а также является индикатором плохого исхода при раке молочной железы, множественной миеломе, колоректального рака и других злокачественных новообразований [36, 49, 189, 195, 247, 342, 375, 638]. В одном исследовании 28% пациентов с амилоидной лейкемией имели повышенный уровень RНАММ. Многовариантный анализ показал, что экспрессия RНАММ в > 5% лейкозных бластов идентифицировала подгруппу пациентов с амилоидной лейкемией с неблагоприятной об-

шей выживаемостью [549]. Установлено, что пациенты с амилоидной лейкемией часто дают рецидивы, и их 5-летняя выживаемость является относительно низкой [87]. Ликвидация остаточных лейкозных клеток у этих пациентов после трансплантации стволовых клеток дала сильный стимул для разработки иммунных методов лечения этого онкологического заболевания. RНАММ был идентифицирован как один из наиболее многообещающих антигенов для лечения амилоидной лейкемии. Были идентифицированы RНАММ-пептиды, которые образуются естественным путем и которые специфически распознаются Т-клетками у здоровых добровольцев и пациентов с амилоидной лейкемией [469, 556]. Показано, что RНАММ-R3- пептид вызывал самый высокий Т-клеточный ответ, и увеличение цитотоксического эффекта Т-лимфоцитов после применения RНАММ-R3-пептида наблюдалось после вакцинации дендритными клетками, полученными из лизатов клеток CLL (Таблица 4). Кроме того, присутствие CD8 + RНАММ-специфических Т-клеток было связано с селективной элиминацией хеморезистентной популяции клеток В-CLL [170]. Проводились клинические испытания фазы I/II для R3-пептида при заболеваниях амилоидной лейкемией, миелодиспластическим синдромом, множественной миеломой на пациентах, получавших либо 300, либо 1000 мкг пептида. RНАММ-R3-пептид продемонстрировал высокую эффективность и низкую токсичность для пациентов [196, 470]. Пациенты, получавшие любую из этих доз, продемонстрировали иммунологические и положительные клинические ответы на пептидную вакцину R3, что свидетельствует о том, что RНАММ-пептиды являются перспективными для дальнейшей таргетной иммунотерапии пациентов с гематологическими злокачественными новообразованиями [188, 196]. В настоящее время RНАММ-пептиды и аутологичные дендритные клетки, полученные из лизатов опухолей, используют в качестве неспецифических вакцин для индукции иммунного ответа при амилоидной лейкемии и В-CLL бластов.

В дополнение к этим гематологическим злокачественным новообразованиям был использован ряд моделей опухолей у мышей для изучения эффективности иммунотерапии на основе RНАММ. Xenopus (x) RНАММ был идентифицирован как ксеногенная мишень для иммунотерапии с использованием перекрестно-реактивного анализа SEREX [613]. ДНК-вакцина на основе xRНАММ индуцировала защитный противоопухолевый иммунитет против локального роста и метастазирования меланомы B16 у мышей. Кроме того, под действием этой ДНК-вакцины ингибировался ангиогенез и стимулировался апоптоз опухолевых клеток, что согласуется с предыдущими сообщениями о роли RНАММ в этих процессах. Также сообщалось о противоопухолевой активности при вакцинации дендритными клетками, трансфицированными RНАММ, на модели глиомы мыши [28].

Опухоли нейробластомы были чувствительны к иммунотерапии на основе RНАММ из-за взаимодействий этого рецептора с AURKA-BRCA1/BARD1-RНАММ-TPX2 в модуле centrosomy в рамках этого рефрактерного заболевания [94, 126, 398].

Таким образом, противоопухолевые вакцины являются новым терапевтическим средством, которое может играть более заметную роль в лечении раковых заболеваний в будущем.

### **Рекомбинантные пептиды, RНАММ-миметики**

Проводились также разработки рекомбинантных пептидов, RНАММ-миметиков, с целью использования их для лечения раковых заболеваний. Показано, что рекомбинантные пептиды, RНАММ-миметики, сильно снижали образование первичных опухолей, а также метастазирование опухолей у животных [337]. Эта антиметастатическая активность пептидов была обусловлена снижением подвижности раковых клеток, а также блокированием клеточного цикла [337]. Блокирование клеточного цикла происходило в результате снижения экспрессии cdc2 и cyclinB1 [337].

### **Пептиды, ГК-миметики, связывающиеся с RНАММ**

Ряд исследований проводилось по разработке пептидов, ГК-миметиков, связывающихся с RНАММ. В нескольких исследованиях использовались случайные фаговые библиотеки, а также рациональный дизайн для идентификации пептидов, которые связываются с RНАММ и блокируют взаимодействия RНАММ с ГК, как новые подходы к специфичной замене ГК-связывающих свойств этого белка [29, 637]. В одном из этих методов использовали фаговую библиотеку, которая содержала высокие уровни отрицательно заряженных L- и D-аминокислот, и первоначально скрининг охватывал те пептиды, которые связывались с рекомбинантным ГК-связывающим фрагментом RНАММ [540, 636]. Положительные кандидаты были проверены на их способность конкурировать с ГК за связывание с рекомбинантным RНАММ с помощью метода ELISA. Было показано, что эти пептиды (например, B2-A) специфично связываются с основными аминокислотами в RНАММ белке, которые, как известно, участвуют в его взаимодействии с ГК. Однако биологические эффекты этих пептидов не были исследованы.

В настоящее время продолжают развиваться разработки пептидов, ГК-миметиков, в качестве терапевтических средств для лечения онкологических заболеваний [77, 212, 213].

Здесь мы рассмотрели экспериментальные доказательства того, что синтетические пептиды, блокирующие специфичные функции RНАММ, обладают противоопухолевым эффектом и являются перспективными кандидатами для лечения раковых заболеваний. Однако незначительное количество исследований о терапевтическом потенциале RНАММ и RНАММ-таргет пептидов для лечения раковых заболеваний свидетельствует о необходимости дальнейших исследований в этой области.

## Глава 2. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1. Линии клеток

В работе были использованы линии клеток: адгезивные клетки карциномы молочной железы человека (MDA-MB-231), адгезивные клетки аденокарциномы протоков молочной железы человека (MCF-7), адгезивные клетки карциномы предстательной железы человека (PC3m-LN4), адгезивные клетки рака яичников (SKVO3). Все эти опухолевые клетки характеризуются повышенной экспрессией RHAMM (Oncomine Research, <https://www.oncomine.org/resource/login.html>). В работе также использовали клетки меланомы кожи (WM1552c, неинвазивные). Для сравнительного анализа в качестве контроля в экспериментах использовали нормальные клетки: мышинные эмбриональные фибробласты (MEF), фибробласты (LR21). Все клеточные культуры были получены из Американской коллекции клеточных культур (American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, Merck, USA). Клеточные линии нокаут мышинных эмбриональных фибробластов RHAMM<sup>(-/-)</sup> и мышинных эмбриональных фибробластов, трансфицированных с RHAMM<sup>(+/+)</sup>, были получены согласно протоколу, описанному в статьях [1, 629, 533, 205]. Все указанные клеточные линии происходят из клеток человеческого организма или мыши. Способ культивирования: адгезивный, в среде DMEM с 10% (v/v) эмбриональной телячьей сывороткой (FBS) и 10 mM HEPES, pH 7,2 при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> и 90% влажности.

### 2.2. Синтез пептидов

Пептиды синтезировали с помощью автоматического пептидного синтезатора (Apex 396 Automated Multiple Peptide Synthesizer, Hill Victoria, Австралия) методом стандартного твердофазного пептидного синтеза (Fmoc deprotection and amino acid coupling Cycles) [2, 24]. Принцип метода заключается в удлинении пептидных цепей на амидных смолах (MBHA, 0,1 ммоль) и состоит из циклов связывания аминокислот, каждый цикл контролируется с помощью теста Кайзера. Повторное снятие защиты с Fmoc проводили на протяжении синтеза (через 15 и 20 мин), используя 20%-й раствор пиперидина в N,N-диметилформиде (DMF). Все аминокислотные связывания проводили с использованием 0,05 M или более высокой концентрации аминокислоты и 5 эквивалентов N,N-диизопропилэтиламина (ДИПЭА) в N,N-диметилформамиде (DMF) с интервалами через 30 и 90 минут.

После каждой стадии связывания аминокислот смола несколько раз промывалась DMF и дихлорметаном (ДХМ) (трижды). Ацилирование аминокислотного конца проводили в течение 15 мин с использованием 10%-го уксусного ангидрида в DMF после снятия Fmoc защиты. Флуоресцентное мечение пептидов проводили посредством реакции аминогруппы пептида с флуоресцентным красителем флуоресцеин-изотиоцианатом (FITC, 4 экв.) в DMF с ДИПЭА (2

экв.) в течение 4 час [244]. Полное снятие защиты с цистеин-содержащих пептидов осуществляли с помощью раствора 94%-й трифторуксусной кислоты (ТФК), 1%-го по объему триизопропилсилана (ТИПС), 2,5%-го 1,2- этандитиола в течение 1,0–1,5 часа. Полное снятие защиты со всех других пептидов проводили с использованием раствора 88% ТФК по объему, 5% воды, 5% фенола, 2% ТИПС в течение 2–4 часов. Далее фильтрат пептидов собирали, осаждали с использованием холодного трет-бутил-метилового эфира и затем снова осаждали центрифугированием при 3000 об/мин при минус 5°С в течение 10 минут. Затем гранулы растворяли в дистиллированной деионизированной воде и лиофилизировали, чтобы получить твердые порошки.

### 2.3. Очистка пептидов

Очистку пептидов проводили методом аналитической и препаративной высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), как описано в статье [163]. Для очистки пептидов использовали системы градиентных растворителей, состоящие из H<sub>2</sub>O + 0,1% ТФК (растворитель А) и CH<sub>3</sub>CN + 0,1% ТФК (растворитель В) при линейной скорости потока 1,5 мл/мин и 20 мл/мин для аналитической и препаративной ВЭЖХ, соответственно. Аналитическая ВЭЖХ проводилась с использованием колонки Grace Vydac Protein/Peptide RP-C18 (4,6 мм × 250 мкм, 5 мкм; Nichrom, Berkshire, Великобритания), а препаративную ВЭЖХ осуществляли с использованием колонки Grace Vydac Protein / Peptide RP-C18 (22,0 мм × 250 мм, 10 мкм; Nichrom, Berkshire, Великобритания).

Поглощение пептидов регистрировали при длинах волн 220 нм и 254 нм с использованием фотодиодного детектора Waters 2998 (Waters Corporation, Milford, MA, США). Во время очистки отбирали фракции пептидов, лиофилизировали и оценивали степень чистоты на масс-спектрометре (Waters Quattro Micro API Mass Spectrometer, Waters Corporation, Milford, MA, США).

В экспериментах использовали следующие пептиды:

VEGEGEEEGEEY (*ValGluGlyGluGlyGluGluGluGlyGluGluTyr*)

EEDFGEEAEEEA (*GluGluAspPheGlyGluGluAlaGluGluGluAla*)

SVEAEAEEGEEY (*SerValGluAlaGluAlaGluGluGlyGluGluTyr*)

GEFEEEAEEVA (*GlyGluPheGluGluGluAlaGluGluGluValAla*)

EAFEDEEEEIDG (*GluAlaPheGluAspGluGluGluGluAspGly*)

FTEAESNMNDLV (*PheThrGluAlaGluSerAsnMetAsnAspLeuVal*)

GEGEEGEE (*GlyGluGlyGluGluGlyGluGlu*)

DFGEEAEE (*AspPheGlyGluGluAlaGluGlu*)

RYQLHPYR (*ArgTyrGlnLeuHisProTyrArg*)

## 2.4. Получение и очистка рекомбинантного белка RHAMM-CT

Рекомбинантный белок RHAMM-CT (aa 706–767, аминокислотная последовательность: RDSYAQLLGH QNLKQKIKHVVKLDENSQL KSEVSKLRSQ LVKRKQNELR LQGELDKLQI, М. м. 7,1 кДа, pI = 10,1; источник-мышь домашняя, *Mus musculus*) выделяли из штамма *E. coli* BL21 (D3), несущего рекомбинантную плазмиду pPAL7-RHAMM-CT. Бактерии выращивали в течение ночи в среде LB при 37°C, содержащей ампициллин (100 мкг/мл) и 0,5%-ю глюкозу, клетки растили до середины логарифмической фазы без добавления изопропилтио-β-D-галактопиранозид (IPTG), индуктора lac-промотора. Затем после повышения оптической плотности культуральной суспензии до OD<sub>600</sub> 0,4–0,6, к клеткам добавляли IPTG до конечной концентрации 2 mM (для индукции lac-промотора и экспрессии рекомбинантного RHAMM-CT) и продолжали растить клетки в течение 4 часов при 37°C. Затем бактериальные клетки осаждали центрифугированием при 10 000 g в течение 20 мин. После этого бактериальные клетки повторно суспендировали в буфере для лизиса (0,2 М фосфат натрия, 0,2 М ацетат калия, 1% тритон X-100 и 0,1% ингибиторы протеазы, pH 7,0), обрабатывали ультразвуком (60 с, 10 с/импульс) и центрифугировали при 12 000 g, при 4°C в течение 20 мин. Полученный супернатант переносили в чистую пробирку и фильтровали (с использованием фильтра 0,45 мкм).

Очистку рекомбинантного RHAMM-CT, связанного с eXact, проводили, используя аффинный сорбент (Profinity eXact, Bio-Rad, США), в соответствии с протоколом производителя [449]. Для этого полученный лизат наносили на гравитационную колонку, упакованную аффинным сорбентом (4 мл Profinity eXact сорбента, колонка 15 × 1,5 см), уравнивали промывочным буфером (0,2 М натрия фосфат, pH 7,0). Колонку промывали буфером для удаления загрязнений и рекомбинантный RHAMM-CT элюировали элюирующим буфером (0,2 М фосфат натрия, 0,1 М фторид натрия, pH 7,0). Затем белок диализовали и концентрировали, используя фильтр (EMD Millipore, Temecula, CA, США) в буфере, состоящем из 0,2 М фосфата натрия и 0,2 М ацетата калия (pH 7,0). Количество выделенного белка определяли по методу Bradford [75] при помощи Bradford Protein Assay (Pierce, США), используя БСА для построения калибровочной кривой. Степень чистоты выделенного белка проверяли методом одномерного электрофореза (10% SDS-ПААГ). Идентификацию RHAMM-CT проводили и подтверждали с использованием моноклональных анти-RHAMM антител методом Вестерн-блот анализа.

### 2.4.1. SDS-полиакриламидный гель электрофорез

Степень чистоты полученного рекомбинантного RHAMM-CT белка определяли методом 10% одномерного SDS-ПААГ электрофореза согласно протоколу, описанному в статье [279]. Аликвоту раствора белка (0,01 мл, 6 мкг белка и 0,005 мл, 3 мкг белка) добавляли к 0,01 мл SDS буфера. SDS буфер содержал 130 mM Tris (pH 6,8), 4,2% (вес/объем) SDS, 20% (объем/объем)

глицерин, 0,003% (вес/объем) бромфеноловый синий, и 10% (объем/объем) 2-меркаптоэтанол (добавляли свежий). Пробирки с образцами нагревали при 90°C в течение 1 мин. Затем образцы RНАММ-СТ белка наносили на 10% SDS-полиакриламидный гель и проводили электрофорез.

#### **2.4.2. Вестерн-блот анализ**

Идентификацию RНАММ-СТ проводили с помощью анти-RНАММ антител методом Вестерн-блот анализа. Вестерн-блот проводили согласно протоколу, описанному в статье [542]. Вкратце: для Вестерн-блота использовали белок RНАММ-СТ. К белку RНАММ-СТ (0,005 мл, 3 мкг) добавляли SDS-буфер (0,5 М Tris, pH 6,8, 50% глицерин, 10% SDS, β-меркаптоэтанол, бромфеноловый синий), затем образец кипятили 5 мин при 100°C. После этого образец центрифугировали при 12000 g в течение 5 мин и супернатант (10 мкл) наносили на полиакриламидный гель с додецилсульфатом натрия и проводили одномерный 10% SDS-ПААГ электрофорез. После разделения белков методом электрофореза гель помещали на мембрану Amersham Hybond-P-PVDF (Sigma-Aldrich, США) и переносили белки с геля методом блоттинга в течение 1–2 часов при напряжении 45 вольт и силе тока 350 мА. Для блокирования центров неспецифического связывания мембрану погружали в Tris-буфер (TBS-T: TBS / 0,1% Твин-20, 5% обезжиренное сухое молоко) и инкубировали 1 час при комнатной температуре на орбитальном шейкере. Далее мембрану промывали дважды с промывочным буфером (TBS/0,1% Tween-20). Затем мембрану инкубировали с первичными антителами. В работе использовали антитела: RНАММ-СТ, первичные мышинные анти-RНАММ 6B7D8 ab (Santa Cruz, CA, США), вторичные мышинные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена (Santa Cruz, CA, США). Первичные антитела разбавляли в соотношении 1 : 1000 в растворе TBS-T и мембрану инкубировали в разбавленных первичных антителах в течение 1 часа при комнатной температуре на орбитальном шейкере. После этого мембрану споласкивали дважды промывочным буфером и затем снова промывали в 50 мл промывочного буфера в течение 15 мин при комнатной температуре. После промывки к мембране добавляли вторичные мышинные антитела, которые разводили в соотношении 1 : 10 000 в растворе TBS-T и мембрану инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре на орбитальном шейкере. Затем мембрану промывали в 50 мл промывочного буфера при комнатной температуре в течение 15 мин. После этого мембрану снова промывали три раза в течение 5 мин свежими сменами промывочного буфера. Затем PVDF-мембрану высушивали на воздухе и определяли сигнал хемилюминесценции с помощью реактива Enhanced chemiluminescence Plus (Perkin Elmer Life Science, MA, Boston, США). После этого мембрану фотографировали, используя прибор для визуализации (Ultra-Lum imaging system, Ultra-Lum Inc., CA Claremont, США).

### 2.4.3. Аланиновое сканирование

Метод аланинового сканирования использовали для того, чтобы определить ключевые аминокислоты пептидов, необходимые для связывания с RHAMM-CT. Метод аланинового сканирования представляет собой систематическую последовательную замену каждой отдельной аминокислоты на аланин (Ala) в аминокислотной последовательности пептида. Замена функционально или структурно незаменимой аминокислоты в пептиде на аланин обычно приводит к снижению или к потере функции пептида. Пептиды были синтезированы с линкером (Ahx-аминогексановая кислота) и флуоресцеиновой меткой, прикрепленной к N-концу [24].

Для аланинового скрининга пептида EEDFGEEAEEEEA были синтезированы следующие пептиды: FITC-Ahx-AEDFGEEAEEEEA-NH<sub>2</sub>, FITC-Ahx-EADFGEEAEEEEA-NH<sub>2</sub>, FITC-Ahx-EEAFGEEAEEEEA-NH<sub>2</sub>, FITC-Ahx-EEDAGEEAEEEEA-NH<sub>2</sub>, FITC-Ahx-EEDAGEEAEEEEA-NH<sub>2</sub>, FITC-Ahx-EEDFGAEEAEEEEA-NH<sub>2</sub>, FITC-Ahx-EEDFGEEAEEEEA-NH<sub>2</sub>, FITC-Ahx-EEDFGEEAAEEEEA-NH<sub>2</sub>, FITC-Ahx-EEDFGEEAEAEA-NH<sub>2</sub>, FITC-Ahx-EEDFGEEAEEAAA-NH<sub>2</sub>.

Для аланинового скрининга пептида FTEAESNMNDLV были синтезированы следующие пептиды: FITC-Ahx-FTEAESNMNDLV-NH<sub>2</sub>, FITC-Ahx-FTEAESNMNDLV-NH<sub>2</sub>, FITC-Ahx-FTEAESNMADLV-NH<sub>2</sub>, FITC-Ahx-FTEAESNMNDLV-NH<sub>2</sub>, FITC-Ahx-FTEAESAMNDLV-NH<sub>2</sub>, FITC-Ahx-FTEAESNMNDLV-NH<sub>2</sub>, FITC-Ahx-FTEAESNMNDLV-NH<sub>2</sub>, FITC-Ahx-FTEAESNMNDLV-NH<sub>2</sub>, FITC-Ahx-FTEAESNMNDLV-NH<sub>2</sub>, FITC-Ahx-FTEAESNMNDLV-NH<sub>2</sub>, FITC-Ahx-FTEAESNMNDLV-NH<sub>2</sub>, FITC-Ahx-FTEAESNMNDLV-NH<sub>2</sub>, FITC-Ahx-FTEAESNMNDLV-NH<sub>2</sub>.

Для аланинового скрининга пептида VEGEGEEEGEEY были синтезированы следующие пептиды: FITC-Ahx-AEGEGEEEGEEY-NH<sub>2</sub>, FITC-Ahx-VAGEGEEEGEEY-NH<sub>2</sub>, FITC-Ahx-VEAEGEEEGEEY-NH<sub>2</sub>, FITC-Ahx-VEGAGEEGEEY-NH<sub>2</sub>, FITC-Ahx-VEGEAEEEGEEY-NH<sub>2</sub>, FITC-Ahx-VEGEGAEEGEEY-NH<sub>2</sub>, FITC-Ahx-VEGEGEAEEGEEY-NH<sub>2</sub>, FITC-Ahx-VEGEGEEAGEY-NH<sub>2</sub>, FITC-Ahx-VEGEGEEEAEEY-NH<sub>2</sub>, FITC-Ahx-VEGEGEEEGAEY-NH<sub>2</sub>, FITC-Ahx-VEGEGEEEGEAY-NH<sub>2</sub>, FITC-Ahx-VEGEGEEEGEEA-NH<sub>2</sub>.

Чистоту пептидов оценивали с помощью масс-спектрометрии ESI (> 90%), как описано в статье [163].

Затем измеряли связывание каждого модифицированного аланином FITC-пептида с рекомбинантным белком RHAMM-CT с помощью ELISA. Вкратце, рекомбинантный RHAMM-CT (100 мкл, 100 мкг/мл в 0,05 М PBS, pH 7,6) иммобилизовали на 96-луночной планшете и инкубировали при 4°C в течение 24 часов. Затем планшету промывали трижды буфером PBS-Tween-20 (0,05%, 200 мкл/лунку) и добавляли блокирующий буфер (5% Tween-20 в PBS, 200 мкл/лунку), планшету инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. Затем планшету снова трижды промывали буфером, как описано выше. После этого в лунки добавляли FITC-пептиды, модифицированные аланином (конечная концентрация пептидов 10 мкг/мл)

[15], и планшету инкубировали в течение 24 часов при 4°C. Затем планшету промывали, как описано выше, и измеряли интенсивность флуоресценции при 485/535 нм. Отрицательный контроль (без иммобилизованного RНАММ-СТ), который показал минимальную фоновую флуоресценцию, вычитался для каждого измерения.

## **2.5. Анализ специфичности связывания пептидов с RНАММ-СТ**

### ***2.5.1. Определение связывания пептидов с RНАММ-СТ методом поверхностного плазмонного резонанса***

Поверхностный плазмонный резонанс проводили согласно методике, описанной в статье [310]. Система ProteON XPR36 использовалась для выбора и скрининга пептидов по отношению к RНАММ-СТ. Для иммобилизации RНАММ-СТ, поверхности сенсорного чипа ProteON GLC36 активировались путем аминного связывания, с использованием 100 мМ EDAC (1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)-carbodiimide, Hydrochloride, Thermo Fisher Scientific, США) и 24 мМ сульфо-NHS (N-hydroxysulfosuccinimide, Thermo Fisher Scientific, США). RНАММ-СТ (30 мкг/мл в бикарбонатном буфере, pH 9,7) впрыскивали на пластину со скоростью потока 30 мкл/мин.

RНАММ-СТ имеет  $pI = 10,1$ , поэтому для контроля использовали бикарбонатный буфер (pH 9,7). Образец бикарбонатного буфера (pH 9,7) впрыскивали на другую сенсорную пластину и использовали в качестве контроля. Затем вводили этаноламин-HCl (1М, pH 8,5) для деактивации любых оставшихся поверхностных групп. Пептиды (10 мкМ в PBS-T, 2%-й диметилсульфоксид) впрыскивали на поверхность пластины, обработанной RНАММ-СТ, со скоростью 50 мкл/мин в течение 3 мин с последующей 10-минутной диссоциацией (т. е. инъекцией PBS-T буфера). Поверхности регенерировали с помощью двух инъекций NaCl (30 мкл, 1М) перед введением следующего пептида. Во всех экспериментах проводили контрольное вычитание, то есть, из данных, полученных из экспериментальной пластины, обработанной RНАММ-СТ, вычитали значения, полученные из контрольной пластины (без RНАММ-СТ).

### ***2.5.2. Определение кинетических констант связывания пептидов с RНАММ-СТ методом поверхностного плазмонного резонанса***

После скрининга пептидов, GWC SPR imager®II система была использована для определения кинетических констант связывания. Тиолсодержащие пептиды (VEGEGEEEGEEY, SVEAEAEEGEEY, EEDFGEEAEAAA, GEFEEEAEEVA, EAFEDEEEIDG, FTEAESNMNDLV) в концентрации 1 мМ в milliQ воде иммобилизовали на малеимид-функционализированный позолоченный чип в течение 3 часов. Избыток пептидов удаляли промывкой milliQ водой. Для исследования связывания, были приготовлены серии концентраций RНАММ-СТ (500 нМ, 750

нМ и 1000 нМ), которые впрыскивали на поверхность иммобилизованных пептидов. После 15 минутной фазы диссоциации, сенсорная поверхность чипа регенерировалась для следующей инъекции образца пептида, посредством обработки двухкратными 10-минутными импульсами инъекции регенерирующего буфера (2М NaCl в HBS-EP, pH 7,4 при 100 мл/мин). Базовая линия возвращалась к первоначальному значению после регенерации, что подтверждало удаление всех связанных аналитов.

Данные были проанализированы и соответствующие константы диссоциации ( $K_D$ ) были получены с помощью нелинейной регрессии, соответствующей модели Ленгмюра. Во всех экспериментах проводили контрольное вычитание, то есть, из данных, полученных из экспериментальной пластины, обработанной пептидом, вычитали значения, полученные из контрольной пластины (без пептида).

### ***2.5.3. Анализ связывания FITC-пептидов с RНАММ-СТ***

Исследовали способность FITC-пептидов (VEGEGEEEGEEY, SVEAEAEEGEEY, EEDFGEEAEAAA, GEFEEEAEEVA, EAFEDEEEEIDG, FTEAESNMNDLV) связываться с рекомбинантным RНАММ-СТ.

Рекомбинантный RНАММ-СТ (100 мкл, 10 мкг/мл в 0,05 М PBS, pH 7,6) иммобилизовали на 96-луночную планшету (конечная концентрация белка 1 мкг/лунку) и инкубировали сутки при 4°C. Затем планшету промывали три раза с буфером PBS-Твин-20 (0,05%, 200 мкл/лунку) и добавляли блокирующий буфер (5% Твин-20 в PBS, 200 мкл/лунку), планшету инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. Затем опять промывали планшету три раза буфером, как описано выше. После этого в лунки добавляли FITC-пептиды (конечная концентрация пептидов 25 мкМ и 50 мкМ) и планшету инкубировали сутки при 4°C. Затем планшету промывали, как описано выше, и измеряли оптическую плотность при 485/535 нм. Отрицательный контроль (без иммобилизованного RНАММ-СТ), который показал минимальную фоновую флуоресценцию, вычитали для каждого измерения.

### ***2.5.4. Анализ конкурентного замещения FITC-пептидами гиалуроновой кислоты на ГК-связывающем центре RНАММ-СТ***

Исследовали способность FITC-пептидов (VEGEGEEEGEEY, SVEAEAEEGEEY, EEDFGEEAEAAA, GEFEEEAEEVA, EAFEDEEEEIDG, FTEAESNMNDLV) конкурировать с ГК за центр связывания на RНАММ-СТ. Рекомбинантный RНАММ-СТ (100 мкл, 10 мкг/мл в 0,05 М PBS, pH 9) иммобилизовали на 96-луночную планшету (конечная концентрация белка 1 мкг/лунку) и инкубировали сутки при 4°C. На следующий день планшету промывали трижды с буфером PBS-Твин-20 (200 мкл/лунку, 0,05% Твин-20), затем в лунки добавляли буфер (200 мкл /лунку, 5% Твин-

20 в PBS) для блокирования неспецифических центров связывания и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. После этого планшету промывали трижды буфером, как описано выше. Затем в лунки добавляли флуоресцеин-меченые пептиды (конечная концентрация 1 мкг/мл) [15] и ГК (Мол. масса 220 кДа, 100 мкл/лунку, исходная концентрация ГК-10 мкг/мл, были сделаны серийные разведения ГК в PBS = 1 : 1, 1 : 2, 1 : 4)(конечные концентрации ГК: 5 мкг/мл; 2,5 мкг/мл, 1,25 мкг/мл) и планшету инкубировали сутки при 4°C. Затем планшету промывали, как описано выше, и измеряли оптическую плотность при 485/535 нм.

#### ***2.5.5. Мечение ГК с помощью Alexa Fluor 647 и Texas Red***

Флуоресцентное мечение ГК с Alexa Fluor 647 или с Texas Red проводили согласно протоколу, разработанному нами ранее и описанному в статье [562]. ГК (Мол. масса 220 кДа, 1,0 мг) конъюгировали с гидразидом-Alexa Fluor 647 или с гидразидом-Texas Red через 1-этил-3-диметиламинопропилкарбодиимид (EDC), связывающий реагент (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, США). Концентрацию гидразида-Alexa Fluor 647 или гидразида-Texas Red титровали для достижения связывания 1 молекулы Alexa Fluor 647 или Texas Red на 10 молекул ГК.

#### ***2.5.6. Анализ конкурентного замещения ГК-Alexa Fluor 647 немечеными пептидами на ГК-связывающем центре RHAMM-CT***

Для того чтобы исследовать способность немеченых пептидов (VEGEGEEEGEEY, SVEAEAEEGEEY, EEDFGEEAEAAA, GEFEEAEAAA, EAFEDEEEIDG, FTEAESNMNDLV) конкурировать с ГК за центр связывания на RHAMM-CT, мы использовали ГК, меченую с флуоресцентным красителем Alexa Fluor 647. RHAMM-CT (100 мкл, 10 мкг/мл в 0,05 М PBS, pH 9) иммобилизовали на 96-луночной планшете (конечное количество белка 1 мкг/лунку) и инкубировали сутки при 4°C. После этого планшету промывали PBS-Твин-20 буфером (200 мкл/лунку, 0,05%, Твин-20) три раза и добавляли буфер (200 мкл/лунку, 5% Твин-20 в PBS) для блокирования неспецифических центров и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. Затем планшету промывали три раза буфером, как описано выше. После этого в лунки добавляли пептиды (10 мкг/мл) и ГК, меченую с Alexa Fluor 647 (Мол. масса 220 кДа, 100 мкл/лунку, 10 мкг/мл в PBS), планшету инкубировали сутки при 4°C. Через сутки планшету промывали, как описано выше, и измеряли флуоресценцию при 650 нм. В качестве отрицательного контроля использовали немеченую ГК.

#### ***2.5.7. Анализ связывания ГК-Texas Red с клетками РМЖ***

Клетки РМЖ (MDA-MB-231 и MCF-7) культивировали на покровных стеклах в течение 12 часов. Затем к клеткам добавляли ГК-Texas Red (Мол. масса 220 кДа) и инкубировали 30

мин. После этого клетки фиксировали в 3%-м параформальдегиде. Полученные слайды исследовали с помощью конфокального микроскопа (Zeiss Axio Imager A1, Германия). Интенсивность флуоресценции ГК-Texas Red определяли количественно с использованием программного обеспечения для анализа изображений Elements 3 (НИН, США).

#### **2.5.8. Анализ связывания RНАММ с ГК**

Связывание RНАММ с ГК (Мол. масса 220 кДа) и фрагментами ГК (Мол. масса 10 кДа) анализировали методом иммунопреципитации, согласно протоколу [533]. Сефарозу (АН-Сефароза 4В, 0,5 г) ресуспендировали в 0,5 М NaCl. Затем сефарозу промывали 3 раза водой (рН = 4,5) для удаления NaCl и ресуспендировали в 1 мл воды (рН = 4,6). ГК (220 кДа или 10 кДа, 1 мг/мл) добавляли к гелю в соотношении 2 : 1 (объем/объем) и инкубировали 30 мин при комнатной температуре. Затем в раствор добавляли EDC (конечная концентрация 0,1 М). В течение часа рН раствора поддерживали на уровне от 4,5 до 5,5 при помощи добавления разбавленного раствора NaOH. Реакцию проводили в течение 24 час при 4°C. Затем сефарозу тщательно промывали водой (рН = 4,5) и уравнивали буфером PBS (рН = 7,6). Фибробласты (LR21), гиперэкспрессирующие RНАММ, лизировали в 1 мл буфера, содержащего фенилметансульфонилфторид (конечная концентрация 0,0002 моль/л), ингибиторы протеазы, (конечная концентрация 0,1%) и инкубировали в течение 1 часа на льду с последующей обработкой ультразвуком (3–10 секунд, с пульсом 50%). Полученный лизат центрифугировали при 13000 g в течение 15 минут и фракцию супернатанта (концентрация белка – 4 мг/мл) использовали для иммунопреципитации. Для этого к 100 мкл сефарозы, конъюгированной с ГК, добавляли 100 мкл клеточного лизата в соотношении 1 : 1 и инкубировали сутки при 4°C. Затем сефарозу центрифугировали при 13000 g в течение 5 минут, после этого супернатант отбрасывали и сефарозу промывали фосфатным буфером (PBS, рН = 7,6) три раза. На последней стадии супернатант отбрасывали, а к сефрoze добавляли SDS-буфер (50 мкл) и нагревали при 90°C в течение 10 минут, чтобы элюировать белки с сефарозы [15]. После этого сефарозу снова центрифугировали при 13000 g в течение 5 минут и фракцию супернатанта анализировали методом SDS-PAGE электрофореза (10%) и Вестерн-блота. Для обнаружения RНАММ в образцах после иммунопреципитации, использовали анти-RНАММ-антитела (кроличьи моноклональные, Epitomics CD 168/RНАММ; Epitomics, Burlingame, CA, США) в разведении 1 : 1000 и вторичные антитела (кроличьи) в разведении 1 : 10 000. Реакцию обнаруживали по хемилюминесценции с помощью реагента Enhanced chemiluminescence plus (Perkin Elmer Life science, Boston, США).

#### **2.5.9. Анализ конкурентного замещения FITC-пептидами гликозаминогликанов на ГК-связывающем центре RНАММ-СТ**

Исследовали способность FITC-пептидов (VEGEGEEEGEEY, EEDFGEEAEAAA, FTEAESNMNDLV) конкурировать с гликозаминогликанами (агрекан, гепарин и хондроитин сульфат) за ГК-связывающий центр на RHAMM-CT. Рекомбинантный RHAMM-CT (100 мкл, 10 мкг/мл в 0,05 М PBS, pH 7,6) иммобилизовали на 96-луночную планшету (конечная концентрация белка 1 мкг/лунку) и инкубировали сутки при 4°C. После инкубации планшету промывали с буфером PBS-Твин-20 (200 мкл/лунку, 0,05% Твин-20) три раза, затем добавляли буфер (200 мкл/лунку, 5% Твин-20 в PBS) и планшету инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа. После инкубации планшету промывали три раза буфером, как описано выше. Затем в лунки добавляли FITC-пептиды (конечная концентрация 1 мкг/мл) [15] и агрекан, гепарин и хондроитин сульфат при различных концентрациях (1, 5 и 10 мкг/мл). Для положительного контроля использовали лунки, в которые добавляли ГК (Мол. масса 220 кДа, 10 мкг/мл) и планшету инкубировали сутки при 4°C. Затем планшету промывали, как описано выше, и измеряли оптическую плотность при 485/535 нм.

#### **2.5.10. Анализ связывания пептидов с CD44 и RHAMM-CT**

Исследовали способность FITC-пептидов (VEGEGEEEGEEY, SVEAEAEEGEEY, EEDFGEEAEAAA, GEFEEAEAAA, EAFEDEEEEIDG, FTEAESNMNDLV) связываться с CD44 и RHAMM-CT. Рекомбинантный CD44 был получен из компании Origene (Rockville, США). Рекомбинантный RHAMM-CT и CD44 (100 мкл, 10 мкг/мл в 0,05 М PBS, pH 7,6) иммобилизовали на 96-луночную планшету (конечная концентрация белка 1 мкг/лунку) и инкубировали сутки при 4°C. Затем планшету промывали три раза с буфером PBS-Твин-20 (0,05%, 200 мкл/лунку) и добавляли блокирующий буфер (5% Твин-20 в PBS, 200 мкл/лунку), планшету инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. Затем опять промывали планшету три раза буфером, как описано выше. После этого в лунки добавляли FITC-пептиды (конечная концентрация 10 мкг/мл), ГК (Мол. масса 220 кДа, 10 мкг/мл) и планшету инкубировали сутки при 4°C. Затем планшету промывали, как описано выше, и измеряли оптическую плотность при 485/535 нм. Отрицательный контроль (без иммобилизации RHAMM или CD44) вычитали для каждого измерения.

#### **2.6. Исследование стабильности пептидов в сыворотке**

Стабильность пептидов (VEGEGEEEGEEY, SVEAEAEEGEEY, EEDFGEEAEAAA, GEFEEAEAAA, EAFEDEEEEIDG, FTEAESNMNDLV) в сыворотке крови оценивали в течение 11 часов. Для этого каждый пептид смешивали с предварительно нагретой (37°C, pH=7,3) эмбриональной бычьей сывороткой (конечный объем образца 3 мл и концентрация пептидов 15 мкМ). Затем из реакционной смеси отбирали аликвоты (40 мкл) через каждые 30 минут и про-

пускали через C18 обратную фазу картриджа (C18 Sep-Pak ©) [15]. Пептиды элюировали из картриджа с использованием 3 мл этанола (70% объем/объем) с 0,1% ТФК, лиофилизировали и анализировали с использованием аналитической обратно-фазовой ВЭЖХ (Grace Vydac белок/пептид RP-C18 колонка 4,6 × 250 мм, 5 мкм). Применяемые мобильные фазы этой системы были 0,1% ТФК в воде (элюент А) и 0,1% ТФК в CH<sub>3</sub>CN (элюент В). Для элюции каждого пептида применяли метод линейного градиента (10–95% элюента В) при скорости потока 1,5 мл/мин в течение 20 мин. Затем содержание интактных пептидов определяли с помощью фотодиодного детектора (Waters 2998, Waters Corporation, MA, Milford, США) при 220 и 254 нм, и пептиды идентифицировали методом электро-спрей ионизационной масс-спектрометрии на масс-спектрометре (ESI-MS, Waters Corporation, MA, Milford, США). Затем вычисляли процент интактных пептидов и представляли это как функцию времени. На основании этого определяли период полураспада пептидов (время полужизни) с использованием версии GraphPad Prism 5,01.

### 2.7. Анализ связывания пептидов с опухолевыми клетками

Клетки РМЖ (линия MDA-MB-231), РПЖ (линия PC3M-LN4) культивировали в среде DMEM + 10% FBS до 90% плотности. Клетки открепляли от поверхности трипсином (0,25%, Stem Cell Technologies, Corning, США) и сеяли на покровные стекла (12 × 12 мм, предварительно покрытые с фибронектином, 50 мкг/мл), которые помещали в культуральные планшеты (24-луночные, плотность посева 20 000 клеток/лунку) [15]. К клеткам в лунки добавляли ростовую среду (DMEM + 0,1% FBS) и проводили стадию «голодания» клеток в течение ночи при 37°C. После этого, клетки стимулировали с DMEM + 10% FBS и растили в течение ночи в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 37°C. На следующий день ростовую среду удаляли из лунок и клетки промывали с ростовой средой DMEM + 0,1% FBS. Для того, чтобы блокировать неспецифичное связывание, к клеткам добавляли раствор 3% БСА в среде DMEM + 0,1% FBS и инкубировали в течение 1 час при комнатной температуре [15]. После этого к клеткам добавляли антитела (разведение 1 : 100, анти-IgG Ab мыши, анти-RHAMM mAb козы или мышинные анти-CD44 mAb в растворе DMEM + 0,1% FBS) и инкубировали при 37°C в течение 1 часа в CO<sub>2</sub>-инкубаторе. Затем ростовую среду удаляли, а клетки опять промывали раствором DMEM + 0,1% FBS. После промывки к клеткам добавляли FITC-пептиды (VEGEGEEEGEEY, EEDFGEEAEAAA, FTEAESNMNDLV, 50 мкг/мл) и инкубировали при 37°C в течение 30 мин [15]. После истечения времени клетки промывали с DMEM + 0,1% FBS, затем с буфером PBS (pH=7.6). Затем покровные стекла извлекали из лунок и на поверхность клеток добавляли Fluoro-gel 11, содержащий в своем составе DAPI (Electron Microscopy Sciences, США) [1]. После этого покровные стекла помещали на предметные (клетками вниз), высушивали и полученные слайды хранили в темноте при 4°C.

Слайды анализировали на конфокальном микроскопе (Olympus FluoView FV1000, Olympus Corporation, Токуо, Япония). Изображения клеток фотографировали с помощью компьютерной программы (Olympus FluoView FV1000 software, FV10-ASW version 01.07: Olympus), которая была соединена с инвертированной системой (IX81) микроскопа [15]. Полученные изображения клеток сохраняли в формате TIFF и затем анализировали с помощью компьютерной программы Image J (НИН, США). Сначала изображения преобразовывали в 8-битный формат и анализировали в интервале пороговых значений 20 и 255 [15]. С помощью программного обеспечения ImageJ были выбраны изображения (ROI, Region of Interest) анализируемых клеток. Среднее значение флуоресценции каждого ROI было получено с использованием 8-битных изображений и представлено в виде гистограммы [15]. Статистический анализ данных проводили с помощью One-Way ANOVA. Различия считались достоверными при (\* –  $p < 0,05$ ). Звездочка указывает на существенную разницу между клетками, обработанными анти-RHAMM антителами, и всеми остальными типами обработки.

### **2.8. Анализ связывания FITC-пептидов с нокаут фибробластами RHAMM<sup>(-/-)</sup> и фибробластами, трансфицированными с RHAMM<sup>(+/+)</sup>**

Мышиные эмбриональные фибробласты [нокаут RHAMM<sup>(-/-)</sup> и RHAMM<sup>(+/+)</sup>] были получены, как описано ранее [1, 16, 205, 533, 629]. Клетки культивировали в среде DMEM + 10% FBS до 90% плотности. Затем клетки открепляли методом трипсинизации и сеяли на покровные стекла (12 × 12 мм), плотность посева клеток была 10 000 клеток/лунку. Стекла предварительно покрывали фибронектином (50 мкг/мл) [1, 15]. Клетки растили в ростовой среде (DMEM + 10% FBS) в течение ночи в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 37°C. После этого к клеткам добавляли FITC-пептиды (VEGEGEEEGEEY, EEDFGEEAEAAA, FTEAESNMNDLV, 50 мкг/мл) [2, 15] и инкубировали при 37°C в течение 30 мин. Затем клетки промывали с PBS буфером (pH=7, 6). После промывки стекла извлекали из лунок и к клеткам [2] добавляли Fluoro-gel 11 с DAPI (Electron microscopy sciences, США), затем покровные стекла помещали на предметные, клетками вниз, высушивали и хранили в темноте при 4°C. Полученные слайды анализировали на флуоресцентном конфокальном микроскопе (Olympus Corporation, Токуо, Япония) и фотографировали изображения клеток с помощью программы Olympus FluoView FV1000 software. Полученные изображения сохраняли в формате TIFF и анализировали с использованием программного обеспечения Image J (НИН, США) [2].

### **2.9. Оценка жизнеспособности клеток флуоресцентным методом**

Для анализа действия пептидов (VEGEGEEEGEEY, EEDFGEEAEAAA, FTEAESNMNDLV, RYQLHPYR) на жизнеспособность клеток использовали метод

AlamarBlue® Cell Viability Assay (ThermoFisher Scientific, США) [1, 14, 471]. Данный метод позволяет определить активность митохондриальных НАДН-дегидрогеназ живых клеток, которые расщепляют НАДН на НАД и  $H^+$ , и образующийся  $H^+$  восстанавливает нефлуоресцентный краситель резазурин (синего цвета) в флуоресцентный резозурин (розового цвета) [2].

Клетки (MDA-MB-231, MEF, PC3m-LN4) засеивали в 96-луночные планшеты по 1000 клеток в лунке в 200 мкл ростовой среды и клетки выращивали в течение 24 час в инкубаторе при 37°C, 5%  $CO_2$  и 95%-й влажности [1]. Затем в лунки добавляли пептиды (10 мкг/мл,  $2 \times 10^{-7}$  М), а в контроль добавляли равное количество PBS буфера и инкубировали в течение 24 час при 37°C. На каждый пептид и контроль использовали не менее трех лунок [2]. Затем добавляли 10 мкл AlamarBlue реагента непосредственно к клеткам в ростовую среду, и интенсивность флуоресценции измеряли через 0,5; 3; 24 и 48 часов. Интенсивность флуоресценции измеряли при 570/590 нм, используя спектрофлуориметр Wallac 1420 (Perkin Elmer, США). Жизнеспособность клеток при действии пептидов оценивалась сравнением интенсивности флуоресценции в экспериментальных лунках с флуоресценцией в контрольных лунках.

### 2.10. Анализ влияния пептидов на апоптоз и некроз клеток

Влияние пептидов (VEGEGEEEGEEY, EEDFGEEAEAAA, FTEAESNMNDLV) на апоптоз и некроз клеток оценивали, используя ELISA<sup>PLUS</sup> Kit (Roche Diagnostic, США), все процедуры проводили согласно протоколу производителя [14, 601]. Индукцию апоптоза и некроза с помощью пептидов определяли измерением гистоновых компонентов моно-, олигонуклеосом (гистоны H1, H2A, H3 и H4), являющихся индикаторами апоптоза и некроза [2, 14, 86, 155].

Клетки рака предстательной железы (PC3m-LN4), клетки рака молочной железы (MDA-MB-231), мышинные эмбриональные фибробласты (MEF) [2, 14] и нокаут мышинные эмбриональные фибробласты RHAMM<sup>(-/-)</sup> высевали на плоскодонные 96-луночные планшеты при плотности 1000 клеток/лунку и клетки выращивали в течение 24 час в инкубаторе при 37°C, 5%  $CO_2$  и 95%-й влажности. Затем в лунки добавляли пептиды (100 мкл/лунку до конечной концентрации 10 мкг/мл,  $2 \times 10^{-7}$  М), а в контроль добавляли равное количество PBS и инкубировали в течение 24 час при 37°C. Оптическую плотность измеряли при  $E_{ex}/E_{em} = 405/490$  нм на спектрофлуориметре Wallac 1420 (Perkin Elmer, США).

### 2.11. Определение активности каспаз-3/7 колориметрическим методом

Для количественного измерения активности каспаз-3/7 использовали Caspase-3/7 Colorimetric Assay Kit (GenScript, США), в соответствии с протоколом производителя [2, 528]. Клетки рака молочной железы человека (MDA-MB-231), клетки рака предстательной железы человека (PC3m-LN4), мышинные эмбриональные фибробласты (MEF) засеивали с плотностью 1

000 клеток/лунку [2] в 24-луночные платы и инкубировали 24 часа в ростовой среде DMEM (Multicell) с 10% FBS. Затем к клеткам добавляли пептиды (VEGEGEEEGEEY, EEDFGEEAEAAA, FTEAESNMNDLV, 100 мкл/лунку, концентрация  $2 \times 10^{-7}$  М) [14] и инкубировали в течение 24 час при 37°C. В контрольные образцы к клеткам добавляли ростовую среду DMEM, содержащую 10% FBS.

Активацию каспаз-3/7 определяли измерением расщепления колориметрического субстрата, специфичного для каспаз-3/7, DEVD-*p*-нитроанилида. Субстрат, DEVD-*p*-нитроанилид состоит из хромофора *p*-нитроанилида (pNA) и синтетического тетрапептида, DEVD (Asp-Glu-Val-Asp), который и расщепляется каспазами-3/7. После расщепления субстрата каспазами 3/7 высвобождался окрашенный хромофор *p*-нитроанилин, который и определяли спектрофотометрически. Измерение оптической плотности производилось с использованием спектрофлуориметра Wallac 1420 (Perkin Elmer, США) при 405 нм [2].

## 2.12. Мечение ГК флуоресцентным красителем (Cy5.5)

Мечение ГК флуоресцентным красителем (Cy5.5) проводили согласно протоколу, описанному в статье [149]. Вкратце: активированный эфир NHS-Cy5.5 (1 мг) растворяли в 1 мл ДМФ. Затем к 0,2 мл раствора NHS-Cy5.5 добавляли 200 мкг EDTA и 1 мг ГК (Мол. масса 220 кДа) и доводили до конечного объема 2 мл с 0,1 М фосфатным буфером (pH 8,3) [15]. Полученный раствор хорошо размешивали на вортексе. Затем раствор инкубировали при комнатной температуре в течение 4 часов. Конъюгированную ГК-Cy5.5 очищали от несвязанной методом гель-фильтрации на сефадексе G-25.

### 2.12.1. Связывание ГК-Cy5.5 с поверхностью клеток рака яичников

Чтобы показать связывание ГК с поверхностью клеток рака яичников, клетки SKVO3 инкубировали с ГК-Cy5.5 (126 мкг/мл) в течение 30 мин в ростовой среде в CO<sub>2</sub>-инкубаторе. В экспериментах [15] по блокированию центра связывания ГК на RНАММ вначале к клеткам добавляли либо анти-RНАММ-mAb козы (разведение 1:100) или немеченую ГК (326 мкг/мл, Мол. масса 220 кДа), либо VEGEGEEEGEEY-пептид (50 мкг/мл) в ростовой среде [15]. Затем клетки инкубировали при 37°C в течение 1 час. После инкубации ростовую среду удаляли и к клеткам добавляли флуоресцентно-меченую ГК-Cy5.5 (126 мкг/мл) [15, 16] и инкубировали в течение 30 мин в CO<sub>2</sub>-инкубаторе. Затем клетки промывали в фосфатно-солевом буфере (pH 7,2), фиксировали в 3%-м формальдегиде при 4°C в течение 30 мин [15, 16] и добавляли Fluogel 11 (с DAPI) для окрашивания клеточных ядер.

На каждый тип обработки клеток делали три слайда, с каждого слайда снимали пять изображений, используя флуоресцентный конфокальный микроскоп (Fluoview FV-1000, Olympus,

Япония, увеличение  $\times 20$  и  $\times 40$ ) [15, 16]. На всех конфокальных изображениях масштаб равен 100 мкм. Интенсивность флуоресценции ГК измеряли при  $E_x/E_m = 358/461$  нм (флуоресценция DAPI) и  $E_x/E_m = 675/694$  нм (флуоресценция Cy5.5) [15, 16]. На конфокальных изображениях флуоресцентно меченая ГК имеет розовую окраску (Cy5.5), ядра клеток синего цвета (DAPI) [15, 16]. Количественный анализ конфокальных изображений проводили с использованием Image J программы (НИН, США, <https://imagej.nih.gov/ij/download.html>) [15]. С помощью программного обеспечения ImageJ были выбраны изображения (ROI, Region of Interest) анализируемых клеток (общее количество клеток 4150) [15]. Среднее значение флуоресценции каждого ROI было получено с использованием 8-битных изображений и представлено в виде гистограммы.

### ***2.12.2. Анализ связывания FITC-VEGEGEEEGEEY пептида с поверхностью клеток рака яичников***

Клетки (SKVO3 и MEF) высевали [15] на стеклянные подложки ( $12 \times 12$  мм, покрытые 50 мкг/мл фибронектином) в планшеты для выращивания культуры тканей ( $2 \times 24$  ячейки) с плотностью 20 000 клеток/лунку и растили в течение 24 часов в  $CO_2$ -инкубаторе [15, 16]. Затем к клеткам добавляли FITC-VEGEGEEEGEEY пептид (50 мкг/мл) и инкубировали при  $37^\circ C$  в течение 30 мин в  $CO_2$ -инкубаторе. В экспериментах по анализу селективности связывания пептида с RНАММ к клеткам SKVO3 предварительно добавляли различные Ab (разведение 1: 100, анти-IgG Ab мыши, анти-RНАММ-mAb козы и анти-CD44-mAb мыши) и инкубировали при  $37^\circ C$  в течение 1 час в  $CO_2$ -инкубаторе. После этого ростовую среду удаляли и к клеткам добавляли FITC-VEGEGEEEGEEY (50 мкг/мл) и инкубировали при  $37^\circ C$  в течение 30 мин в  $CO_2$ -инкубаторе [15]. Затем клетки промывали фосфатно-солевым буфером (pH 7,6) и фиксировали формальдегидом (3,7%) в течение 30 мин при  $37^\circ C$  [15]. После этого к клеткам добавляли Fluoro-gel 11 (с DAPI) для окрашивания ядер клеток в соответствии с методикой производителя.

После окрашивания и высушивания слайдов клетки [15] анализировали методом конфокальной микроскопии при  $E_x/E_m = 358/461$  нм (флуоресценция DAPI) и  $E_x/E_m = 495/519$  нм (флуоресценция FITC) [15, 16]. Конфокальные изображения получали при увеличении  $\times 20$  и  $\times 40$  с помощью конфокального микроскопа (Fluoview FV-1000, Olympus Corporation, Tokyo, Япония) [15]. На конфокальных изображениях флуоресцентно меченый VEGEGEEEGEEY пептид имеет зеленую окраску (FITC), ядра клеток синего цвета (DAPI). Изображения анализировали с помощью программы Fluoview software (FV10-ASW version 01.07: Olympus, Япония) [15]. На всех конфокальных изображениях масштаб равен 100 мкм. Количественный анализ конфокальных изображений осуществляли с помощью компьютерной программы Image J (НИН, США), были выбраны области изображений клеток (ROI), всего было проанализировано 4 100 клеток [15].

### 2.13. Анализ центра связывания FITC-пептидов (GEGEEGEE и DFGEEAEE) с клетками РПЖ методом конфокальной микроскопии

Клетки рака предстательной железы (PC3m-LN4) высевали на круглые стеклянные подложки (12 × 12 мм, предварительно покрытые раствором фибронектина, 50 мкг/мл) в планшеты для выращивания культуры тканей (2 × 24 лунки) с плотностью 10 000 клеток в лунке и растили в течение 24 часов в CO<sub>2</sub>-инкубаторе. Затем к клеткам добавляли FITC-GEGEEGEE и FITC-DFGEEAEE пептиды (40 мкг/мл в каждой лунке) и инкубировали при 37°C в течение 30 мин в CO<sub>2</sub>-инкубаторе. Для экспериментов по анализу селективности связывания пептидов с RНАММ рецептором, к клеткам предварительно добавляли различные антитела (разведение 1 : 100, анти-FcR Ab мыши, анти-RНАММ mAb мыши и анти-CD44 mAb мыши) в ростовую среду [15] и инкубировали при 37°C в течение 1 часа в CO<sub>2</sub>-инкубаторе. После этого ростовую среду удаляли, клетки промывали PBS три раза, затем к клеткам добавляли FITC-пептиды (40 мкг/мл в каждой лунке) и инкубировали при 37°C в течение 30 мин в CO<sub>2</sub>-инкубаторе [15]. После этого, клетки снова промывали PBS (pH 7,6) и фиксировали формальдегидом (3,7%) в течение 30 мин при 37°C [15]. Затем круглые стеклянные подложки переносили на покровные стекла, добавляли к клеткам Fluoro-gel 11 (с DAPI) для окрашивания ядер клеток в соответствии с методикой производителя.

Окрашенные клетки визуально исследовали с помощью конфокального микроскопа при  $E_x/E_m = 358/461$  нм (флуоресценция DAPI) и  $E_x/E_m = 495/519$  нм (флуоресценция FITC). Конфокальные изображения получали с помощью лазер-сканирующего конфокального микроскопа (Fluoview FV-1000; Olympus, Япония) при увеличении x20 для количественного анализа с 1.0 zoom фактором. Затем конфокальные изображения анализировали с помощью программы Fluoview software (FV10-ASW version 01.07; Olympus, Япония). На конфокальных изображениях FITC-пептиды имеют зеленую окраску (FITC), ядра клеток синего цвета (DAPI). Для количественного анализа конфокальных изображений использовали программу Image J (НИН, США). Данные представляются как средние от трех повторных экспериментов. Для каждого типа обработки клеток приготавливали три слайда, и с каждого слайда снимали пять изображений. С помощью программного обеспечения ImageJ были выбраны области интереса (ROI) и проанализировано 6 158 клеток. Среднее значение флуоресценции каждого ROI было получено с использованием 8-битных изображений и представлено в виде гистограммы. Статистический анализ данных проводили с помощью One-Way ANOVA. Различия считались достоверными при (\* –  $p < 0,05$ ). Звездочка указывает на существенную разницу между клетками, обработанными анти-RНАММ-антителами, и всеми остальными типами обработки.

### 2.14. Анализ влияния пептидов на инвазивность клеток с помощью метода деградации флуоресцентного желатина

Для изучения влияния пептидов (VEGEGEEEGEEY, EEDFGEEAEAAA, FTEAESNMNDLV, RYQLHPYR) на образование инвадоподий использовали QCM<sup>TM</sup> Gelatin Invadopodia assay (red) kit (Millipore, США) [15, 16, 354]. Данный метод основан на быстром обнаружении деградации флуоресцентно-меченого желатина клетками [15, 16, 27]. Эффект пептидов на образование инвадоподий исследовали по их влиянию на степень деградации желатина [15, 16]. Все процедуры проводили в соответствии с протоколом производителя [15, 354].

#### **Приготовление субстрата и посев клеток**

Чтобы ускорить адгезию флуоресцентного желатина к стеклу, сначала круглые стеклянные подложки в планшете (24 лунки) покрывали разбавленным поли-L-лизином (250 мкл/лунке) в дистиллированной воде в течение 20 мин при комнатной температуре, чтобы би-функционально «активировать» поверхность для дальнейшего связывания желатина. Затем избыток поли-L-лизина удаляли и подложки промывали три раза с PBS (pH = 7,4, 500 мкл/лунке). После этого в каждую лунку добавляли глутаральдегид (250 мкл) и инкубировали в течение 15 мин, чтобы активировать поверхностный поли-L-лизин для дальнейшего присоединения желатина. Затем глутаральдегид удаляли и каждую лунку промывали 3 раза с PBS (500 мкл). Наконец, 200 мкл желатина в PBS смешивали в соотношении 1 : 5 = Су3-флуоресцентно-меченый желатин : немеченый желатин и добавляли в каждую лунку, выдерживали 10 мин при комнатной температуре, в результате чего образовывалась ковалентная связь между поли-L-лизином и желатином через реакционноспособные альдегидные (-CHO) группы. Затем стекла промывали 3 раза с PBS [15]. Все стадии, включая нанесение флуоресцентного желатина, проводили в приглушенном свете, чтобы защитить слайды от фото-высвечивания. Перед посевом клеток желатиновые подложки обрабатывали с 70%-м этанолом (500 мкл/лунке) в течение 30 мин при комнатной температуре. После удаления этанола и промывки в PBS, свободные альдегиды «тушили» добавлением ростовой среды (500 мкл/лунке), содержащей аминокислоты, и снова инкубировали при комнатной температуре 30 мин.

Клетки карциномы предстательной железы человека (PC3m-LN4), клетки карциномы молочной железы человека (MDA-MB-231), клетки меланомы кожи (WM1552c), мышинные эмбриональные фибробласты (MEF) [15] выращивали до 70–80%-й плотности на чашках Петри. Для посева на желатиновые поверхности, клетки обрабатывали 0,25%-м трипсином-ЭДТА, осаждали, затем ресуспендировали в ростовой среде до концентрации 1 000 клеток/мл [15]. Затем клетки сеяли в объеме 500 мкл/лунку (500 клеток/лунку) и культивировали в течение 40 час. Для эксперимента по влиянию пептидов на инвазивность клеток, пептиды (конечная концентрация 40 мкг/мл в каждой лунке) добавляли к ростовой среде и инкубировали в течение 40 час при 37°C и 5%-м CO<sub>2</sub>.

#### **Фиксация образцов и окрашивание**

После культивирования клеток и инкубации с пептидами в течение 40 час, ростовую среду удаляли из лунок планшеты и клетки фиксировали 3,7%-м формальдегидом в PBS (250 мкл/лунке) в течение 30 мин при комнатной температуре. Затем образцы промывали дважды с буфером PBS, содержащим 2% БСА и 0,25% Тритон X-100. После этого образцы промывали трижды с PBS (500 мкл/лунку), добавляли FITC-фаллоидин (2 мкг/мл для визуализации актинового цитоскелета) и DAPI (1мкг/мл для окрашивания ядер), соответственно, чтобы анализировать одновременно деградацию желатина и локализацию клеток [1, 15]. Образцы инкубировали 1 час при комнатной температуре. Наконец, образцы промывали дважды с PBS и стеклянные подложки переносили из планшеты на предметные стекла, добавляли Fluoro-gel 11 (с DAPI) и после высушивания анализировали на конфокальном микроскопе при  $E_x/E_m = 358/461$  нм (флуоресценция DAPI),  $E_x/E_m = 495/519$  нм (флуоресценция FITC) и  $E_x/E_m = 550/570$  нм (флуоресценция Cy3) [15].

### **Анализ конфокальных изображений**

Конфокальные изображения получали с помощью лазер-сканирующего конфокального микроскопа (Fluoview FV-1000; Olympus, Япония) при увеличении  $\times 20$  для количественного анализа с 1.0 zoom фактором и при увеличении  $\times 60$  (oil immersion) с 2.0 zoom фактором. Конфокальные изображения снимали с помощью программы Fluoview software (FV10-ASW version 01.07: Olympus, Япония). На конфокальных изображениях флуоресцентно-меченый желатин имеет красную окраску (Cy3), актин клеток имеет зеленую окраску (FITC-фаллоидин), ядра клеток синего цвета (DAPI), а область деградации желатина черного цвета (флуоресценция отсутствует). Количественный анализ изображений, подсчет числа клеток, площади клеток и площади деградации желатина проводили, используя программу ImageJ software (НИН, США). На изображениях, полученных с помощью этой программы, ядра клеток черного цвета, площадь клеток черного цвета, а площадь деградации желатина белого цвета. Процент деградации желатина вычисляли, как отношение площади деградации желатина к общей площади клеток. Для статистического анализа готовили 3 слайда на каждый тип обработки и снимали 5 изображений со слайда. В каждом образце анализировали 100–400 клеток, чтобы получить процент площади деградации желатина по отношению к общей площади клеток. Данные представляются как средние от трех повторных экспериментов.

### **2.15. Анализ влияния пептидов на пролиферацию клеток РМЖ и РПЖ с использованием бромдезоксисуридина (BrdU)**

Для количественной оценки влияния пептидов на пролиферацию клеток использовали набор ELISA BrdU (колориметрический, Roche Diagnostic, Laval, Канада). Все процедуры проводили в соответствии с прилагаемым протоколом производителя [1, 2]. Клетки (PC3m-LN4 и MDA-MB-231), засеивали в 96-луночные планшеты по 1000 клеток в лунке в 200 мкл ростовой

среды и клетки выращивали в течение 24 час в инкубаторе при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> и 95%-й влажности. Затем в лунки добавляли пептиды (10 мкг/мл, 2×10<sup>-7</sup> М), а в контроль добавляли равное количество PBS буфера и инкубировали в течение 24 час при 37°C. На каждый пептид и контроль использовали не менее трех лунок. К клеткам добавляли BrdU (5-бром-2'-дезоксинуридин, 100 мкМ, 10 мкл/лунку), и клетки повторно инкубировали в течение 24 часов. Затем ростовую среду удаляли, клетки фиксировали и денатурировали ДНК, добавляли раствор FixDenat (90%-й этанол) и инкубировали 5 минут. После инкубации этанол удаляли и добавляли 2М HCl/0,5% Triton X-100 и инкубировали в течение 30 минут. Затем раствор FixDenat удаляли и добавляли раствор анти-BrdU-антител (100 мкл/лунку), конъюгированных с пероксидазой хрена, и инкубировали 90 мин при 25°C. После инкубации раствор антител удаляли, и лунки трижды промывали PBS буфером (300 мкл/лунку). Затем буфер удаляли из лунок и добавляли раствор ТМВ (3, 3', 5, 5'-тетраметилбензидин, субстрат для пероксидазы, 100 мкл/лунку). После этого реакционную смесь инкубировали при 25°C в течение 15 мин. Образующийся продукт реакции количественно определяли, измеряя оптическую плотность при E<sub>ex</sub>/E<sub>em</sub> = 405/490 нм на спектрофлуориметре Wallac 1420 (Perkin Elmer, США). Пролиферация клеток при действии пептидов оценивалась сопоставлением оптической плотности в экспериментальных лунках с оптической плотностью в контрольных лунках [1, 2].

## 2.16. Анализ влияния пептидов на рост опухоли у ксенографтов (мышинная модель опухолевого роста)

### Опухолевый материал для трансплантации

Клетки рака предстательной железы человека (PC3m-LN4) были получены из коллекции клеточных культур American Type Culture Collection (Manassas, Virginia, Merck, США). Для получения стандартного прививочного материала клетки культивировали в среде DMEM с добавлением 10% (объем/объем) FBS и 100 ед/мл пенициллин-стрептомицина и 10 мМ HEPES, pH 7,2. Клетки поддерживали в логарифмической фазе роста при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> и 90%-й влажности.

### Животные

В эксперименте использовали животных (иммунодефицитные мыши, NOD CRISPR *Prkdc* *Il2r* Gamma (NCG) Triple-Immunodeficient Mouse Model, Nomenclature: NOD-*Prkdc*<sup>em26Cd52</sup>*Il2rg*<sup>em26Cd22</sup>/*NjuCr1*), у которых отсутствовал трансплантационный иммунитет. Эти мыши были специально созданы для имплантации клеток рака предстательной железы. Мыши-самцы (4-недельные, 16–18 г) были приобретены в компании Charles River (San Francisco, CA, США). Для содержания животных использовали специальный отсек вивария (в SPF-зоне), где поддерживался специальный температурно-влажностный режим, мышей содержали индивидуально при температуре 24±1°C в помещении с контролируемой освещенностью (свет: 7:00–

19:00, темнота: 19:00–7:00 ч) и относительной влажностью  $55 \pm 5\%$  [17]. Для содержания животных использовали стерильную воду, стерильный экструдированный корм и стерильную подстилку. Во время содержания животных соблюдались все требования, предъявляемые к конвенциональным животным. Для проведения экспериментов мышей подбирали по массе тела с разницей не более 10% у разных особей, количество мышей в каждой группе было равно ( $n = 9$ ) [17].

### **Пептиды**

Пептиды (GEGEEGEE, DFGEEAEE и RYQLHPYR) растворяли в стерильном 0,9%-м растворе натрия хлорида до нужной концентрации [17].

### **Трансплантация ксенографтов**

Клетки PC3m-LN4 растили до логарифмической фазы и плотности 90 %, затем клетки открепляли методом трипсинизации (0,25%-й трипсин-ЭДТА) и получали клеточную суспензию (концентрация клеток была  $2 \times 10^7$ /мл) [17]. К клеткам добавляли пептиды GEGEEGEE, DFGEEAEE и RYQLHPYR [15] (конечная концентрация 40 мкг/мл, доза для инокуляции мышей составляла 2,5 мг/кг). К контрольным клеткам (без пептидов) добавляли равное количество ростовой среды (стерильной). В опыте использовали 4 группы мышей: 1 группа использована для контроля роста опухолей (КРО), им вводили клетки без обработки пептидами ( $n = 9$ ), 3 группы ( $n = 9$ ) получали клетки РПЖ, обработанные пептидами. Клеточную суспензию (100 мкл, концентрация клеток  $2 \times 10^7$ /мл) вводили в левую подкожную переднюю часть, в подмышечную впадину 4-недельных мышей в асептических условиях. О стандартности моделей у мышей судили по 100%-й прививаемости опухолей.

### **Оценка противоопухолевого эффекта**

Выявление опухолевых узлов под кожей у мышей проводили методом визуального наблюдения и пальпацией места трансплантации. Появление опухолей наблюдалось в течение 8 дней после инокуляции, они были диаметром 2 мм, что указывало на то, что опухолевая модель была успешно создана. После появления опухолей проводили регулярные измерения размеров опухолей с использованием штангенциркуля. За ростом опухолей наблюдали в течение месяца после трансплантации по размерам опухолевых узлов. Пальпацию опухолевых узлов проводили каждые 2 дня и измеряли длину опухоли (а) и ширину (б) для построения кривой роста опухоли [17]. Объем опухоли рассчитывали в динамике по следующей формуле ( $V = a \times b^2 / 2$ , мм<sup>3</sup>), что позволило рассчитать средние объемы ( $V_{cp}$ ), а также относительную скорость роста опухолевых узлов, как соотношение объемов ( $V_n / V_{n-1}$ , где  $n$  – номер измерения).

Для оценки противоопухолевого эффекта использовали стандартный показатель торможения роста опухоли – Т/С, % (обработка пептидами/контроль), критерий  $T/C \leq 42\%$ .

Через 15 дней было заметно, что размер опухолей у мышей в контрольной группе (получавших клетки, без инкубации с пептидами) возрастает, а в экспериментальной группе (получавших клетки, предварительно инкубированные с пептидами) рост опухолей замедляется. С 20-го дня стало заметно, что объем опухолей в группе мышей (получавших клетки, обработанные пептидами, концентрация 40 мкг/мл, доза для инокуляции мыши 2,5 мг/кг) был значительно меньше, чем в группе мышей, необработанных пептидами (контрольные опухоли). На 35-й день эксперимента животных умерщвляли с применением гуманных методов, опухоли вырезали и взвешивали. Все эксперименты проводились в строгом соответствии с рекомендациями руководства по уходу и использованию лабораторных животных (Animal Use Protocol 2009:060, UWO, Канада, НИИ, США).

### 2.17. Статистическая обработка результатов

Все клеточные эксперименты *in vitro* и эксперименты *in vivo* дублировались три раза, и данные представлены как средние от трех повторных экспериментов.

Статистический анализ данных проводили с использованием программы GraphPad Prism, One-Way ANOVA. Определение статистически значимых различий для сравнения двух групп проводили, используя Turkey-тест. Звездочка указывает на статистически значимые различия между положительным контролем и всеми остальными типами обработки. Различия считались достоверными при (\* –  $p \leq 0,05$ ; \*\* –  $p \leq 0,005$ ; \*\*\* –  $p \leq 0,0005$ ).

### Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

#### 3.1. Идентификация, дизайн и синтез пептидов, специфично связывающихся с RНАММ

Как описано ранее в разделе «Обзор литературы», повышенная экспрессия RНАММ наблюдается при различных видах онкологических заболеваний. Поэтому RНАММ рецептор является терапевтической мишенью для лечения рака.

В этой части работы мы поставили перед собой 3 основные задачи: 1) идентифицировать и синтезировать пептиды-лиганды, которые связываются с RНАММ; 2) исследовать специфичность связывания синтезированных пептидов с RНАММ и их способность блокировать ГК/RНАММ взаимодействия; 3) исследовать связывание пептидов опухолевыми клетками.

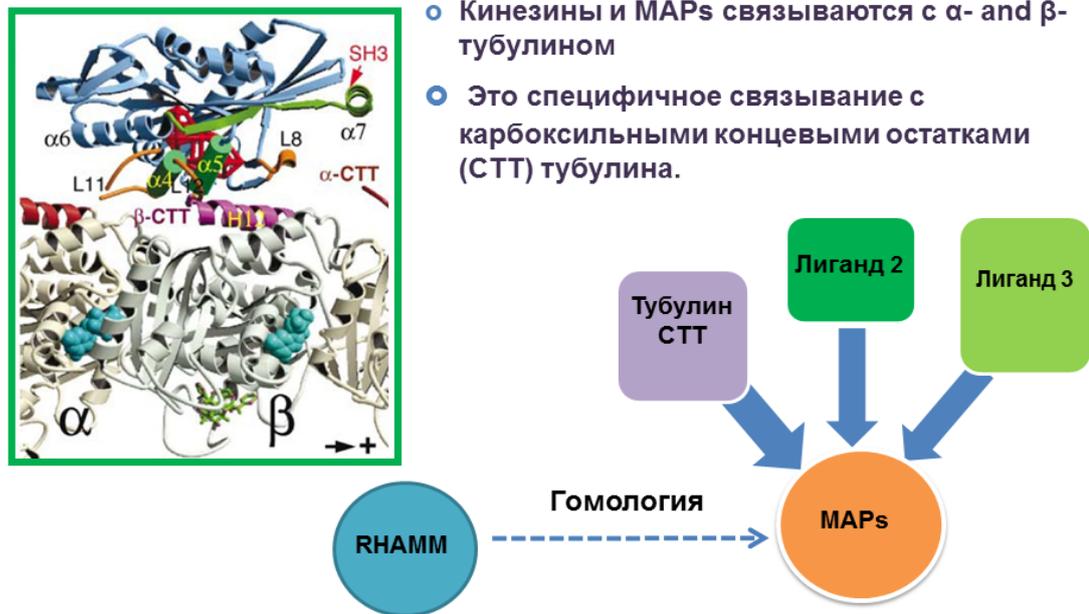
##### *3.1.1. BLAST поиск и сравнительный анализ аминокислотных последовательностей белков*

Предыдущие исследования выявили отрицательно заряженные пептиды, напоминающие по структуре гиалуроновую кислоту с отрицательно заряженными карбоксильными остатками, которые связывались с RНАММ [29, 540, 636, 637]. Эти результаты предсказали, что отрицательно заряженные пептиды являются важными для связывания с ГК-связывающей областью RНАММ, и это привело нас к гипотезе, что известные лиганды для ГК-связывающей области RНАММ и гомологичные белки могут представлять потенциальные пептиды, обладающие специфичным сродством к RНАММ. Установлено, что ГК-связывающая область RНАММ находится на С-конце и состоит из двух спиралей, которые содержат ключевые гидрофобные и основные аминокислоты, необходимые для связывания с ГК [29, 341, 531, 611]. Установлено ранее, что синтетические пептиды, а не случайные последовательности, ингибируют связывание ГК с рекомбинантным RНАММ [212, 213, 636, 637]. Эти результаты предсказали, что взаимодействие олигосахарида ГК с RНАММ носит в основном ионный характер, с незначительным вкладом от гидрофобных остатков. Ранее было показано, что RНАММ также связывается с  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединицами тубулина через N-терминальную последовательность и последовательность, которая находится на С-конце, а именно с ГК-связывающей областью RНАММ [610]. Димер  $\alpha$ - и  $\beta$ -тубулина содержит высоко консервативную спиральную область и последовательность гипервариабельного карбоксильного концевых хвоста (СТТ) с кислыми остатками, мало чем отличающимися по плотности отрицательного заряда от ГК (Рисунок 12) [99, 147, 393]. Эти аминокислотные остатки тубулина способны модулировать динамику микротрубочек за счет связывания с положительно заряженными аминокислотными остатками MAP, которые похожи на аминокислотную последовательность области связывания ГК в RНАММ [228, 328, 465].

Известно, что тубулин является мишенью для противоопухолевых препаратов, таких как паклитаксел, таксол, доцетаксел и колхицин. Ранее было показано, что колхицин связывается с

тубулином, блокирует его и тем самым препятствует формированию микротрубочек [106, 152]. На этих свойствах тубулина основано его применение для лечения воспалительных и онкологических заболеваний [106, 152, 315].

## Тубулин-связывающий домен

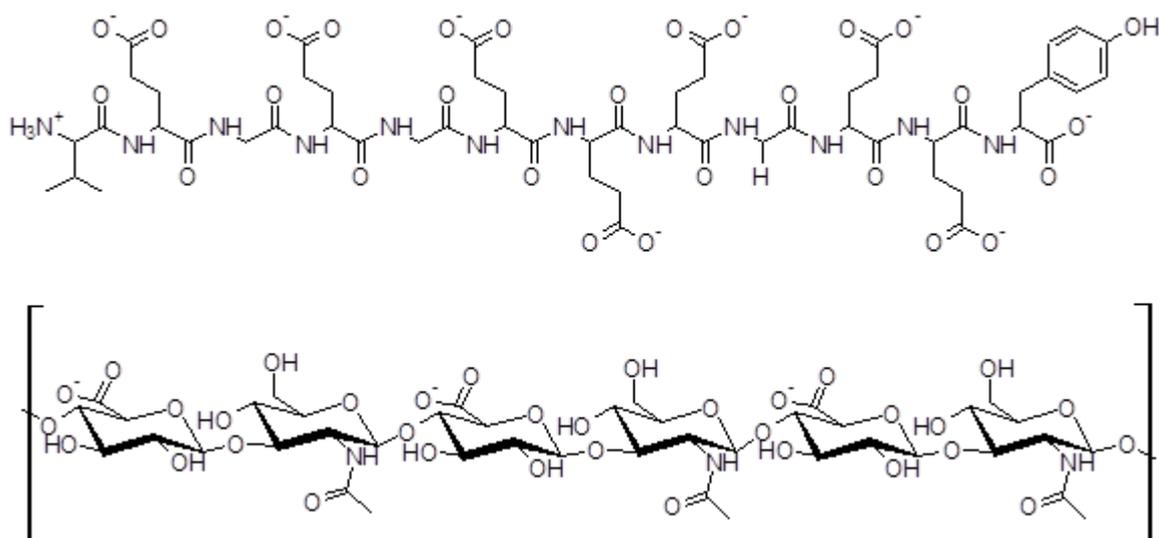


**Рисунок 12** – Схема тубулин-связывающего домена MAP и кинезинов. Адаптировано из: Maxwell et al., 2003 [341].

Поскольку эти области MAPs и кинезинов связываются непосредственно с отрицательно заряженными СТТ концами тубулина, было показано, что аминокислотные последовательности СТТ тубулина могут также связываться с основными аминокислотами RHAMM [130, 491].

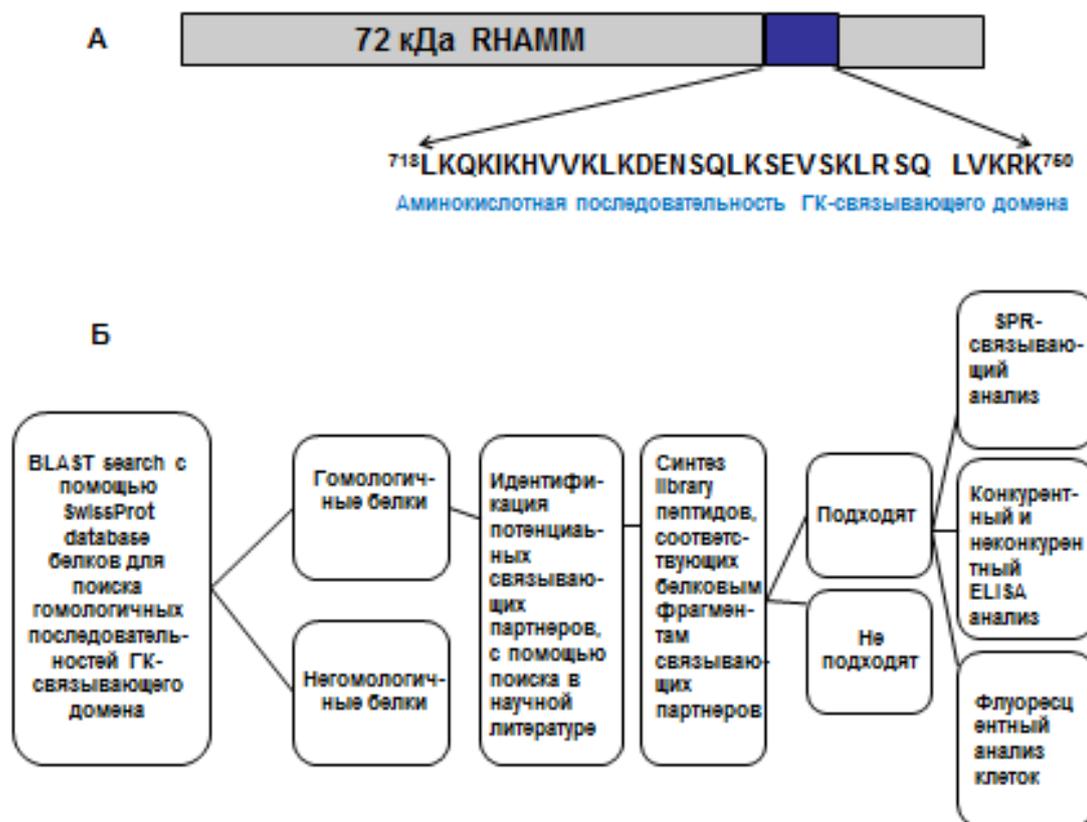
В совокупности эти исследования показали, что взаимодействие RHAMM с тубулином молекулярно похоже на взаимодействие RHAMM и ГК, и что короткая аминокислотная последовательность СТТ может действовать как имитатор ГК (Рисунок 13).

На основании вышесказанного мы предположили, что пептиды с отрицательно заряженными аминокислотами, такими как глутаминовая (Glu) и аспарагиновая (Asp), будут имитировать структуру ГК. Ранее было обнаружено, что RHAMM связывается с  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединицами тубулина, так как СТТ-концы последовательностей этих субъединиц содержат много аминокислот с отрицательным зарядом [228, 465, 610]. Таким образом, мы предположили, что синтетические пептиды, полученные из карбоксильных концов  $\alpha$ - или  $\beta$ -тубулина, могут быть использованы для специфичного, адресного связывания с RHAMM.



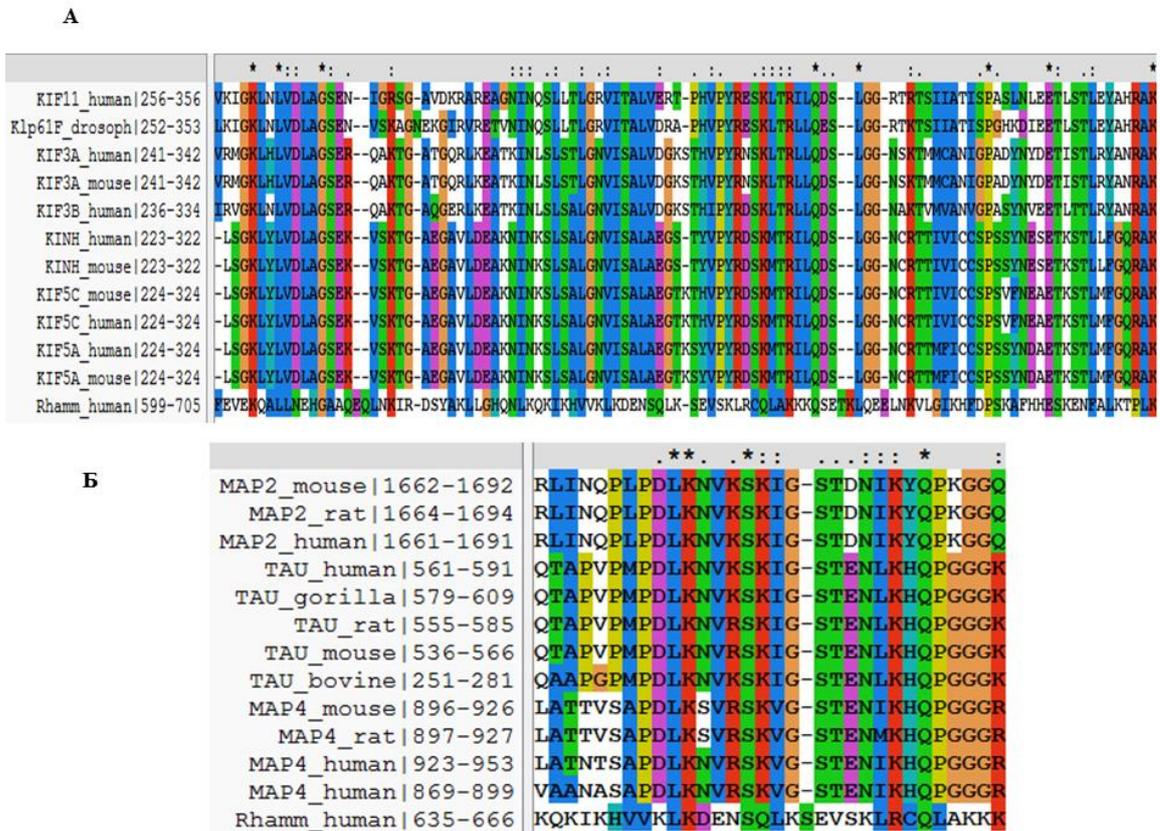
**Рисунок 13** – Химическая структура предполагаемого пептида, имитатора ГК (вверху) и структура ГК (внизу), указывающая на карбоксильные остатки, необходимые для связывания с RHAMM.

На основании этого нами была предложена схема для дизайна и идентификации RHAMM-таргет пептидов (Рисунок 14).



**Рисунок 14** – Схема модели для дизайна и идентификации RHAMM-лигандов. (А) Диаграмма RHAMM (Мол.масса 72 кДа), содержащего ГК-связывающий домен (aa 718–750), необходимый для RHAMM и ГК взаимодействий. (Б) Схема дизайна и исследования специфичности связывания пептидов-лигандов с RHAMM.

Мы впервые использовали аминокислотную последовательность (aa 718–750), соответствующую ГК-связывающей области RHAMM, в поисковых программах BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, США) и UniProtKB/Swiss-Prot (США) для поиска гомологичных последовательностей в белках (Рисунок 15).



**Рисунок 15** – Сравнение ГК-домена RHAMM с тубулин-связывающим доменом тубулин-ассоциированных белков. Сравнение последовательности ГК-связывающего домена RHAMM против: (А) моторного домена моторных белков микротрубочек и (Б) тубулин-связывающего домена белков, ассоциированных с микротрубочками (MAPs). Каждая аминокислотная последовательность сравнивалась с ГК-доменом RHAMM с помощью программы ClustalX2. ГК-связывающий домен RHAMM показан красным цветом. Одинаковые, консервативные и полуконсервативные аминокислотные остатки обозначены как (\*), (:) и (.), соответственно.

Нами были получены предполагаемые партнеры-лиганды с гомологичными аминокислотными последовательностями. Результаты показали, что попарные сравнения между RHAMM и доменами, связывающими микротрубочки MAP (например, MAP1-4, TAU), а также кинезинами (например, KIF11, Klp61), выявили только умеренную гомологию общей последовательности (17–24%) с ГК-связывающим доменом RHAMM (Рисунок 15). Однако установлено, что RHAMM и многие из этих белков имеют сходные области основных аминокислотных остатков во вторичной структуре  $\alpha$ - и  $\beta$ -спиралей (Рисунок 12).

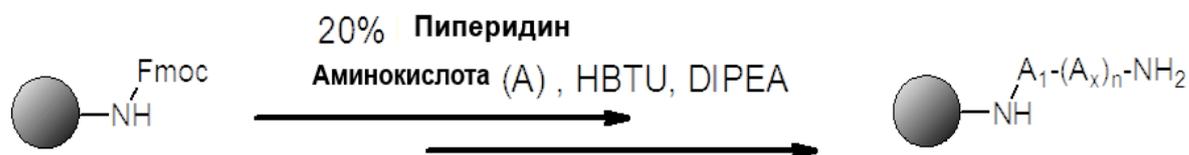
Теоретическая аминокислотная последовательность пептидов  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц тубулина была получена с помощью программы MASCOT Distiller (Matrix Science, версия 2.3.0.0, США), как было описано ранее [106]. Алгоритмы Protein and Peptide Prophet в Scaffold (версия 3-00-03,

Proteome Software Inc., США) были использованы для оценки результатов базы данных. На основании полученных данных была создана библиотека пептидов, аминокислотные последовательности которых происходили из  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц тубулина.

Далее синтезировали пептиды из библиотеки и определяли специфичность их связывания с RНАММ, используя различные физико-химические, биохимические методы *in vitro*.

### 3.1.2. Синтез пептидов

Пептиды, соответствующие СТТ областям аминокислотных последовательностей  $\alpha$ - и  $\beta$ -тубулина, которые состоят из кислых остатков, были синтезированы в соответствии со стандартным протоколом, описанным в «Методах исследования» (Рисунок 16) [163].



**Рисунок 16** – Схема синтеза пептидов. Адаптировано из: Albericio, 2000 [24].

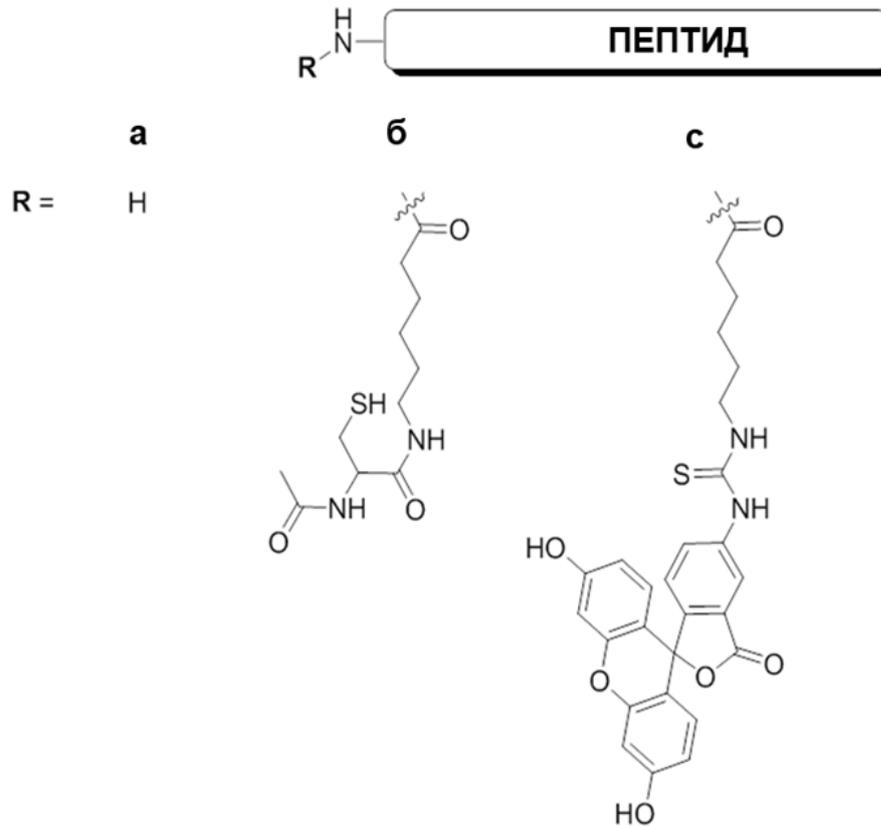
Последовательности тубулина были выбраны на основе наиболее распространенных изоформ тубулина, в частности, из  $\alpha$ - и  $\beta$ -тубулина и наиболее кислой области белка. Большинство последовательностей пептидов были получены из СТТ-последовательности тубулина, но некоторые содержали последовательности  $\alpha 1a$ -H12 (соединения 6, 7 и 8, Таблица 5) и  $\beta 3a$ -H12 (соединения 13 и 14, Таблица 5). Флуоресцентно меченые пептиды были получены мечением модифицированного N-конца с помощью флуоресцеина или N-ацетилцистеина с добавлением спейсера аминоксановой кислоты для увеличения расстояния между пептидом и красителем (или цистеином) (Рисунок 17).

На основании анализа аминокислотной последовательности изоформ тубулина, двадцать пептидов были получены и далее охарактеризованы. Синтезированные пептиды анализировали с помощью масс-спектрометрического метода (ESI-MS) и ВЭЖХ (Таблица 5). В таблице 5 представлены теоретически рассчитанные и экспериментальные значения  $m/z$ , полученные с помощью ESI-MS. Степень чистоты пептидов (%) определяли с помощью ВЭЖХ при 220 нм.

### 3.1.3. Получение и очистка рекомбинантного белка RНАММ-СТ

Для идентификации пептидов, обладающих высоким сродством к ГК-связывающему домену RНАММ, мы использовали различные физико-химические методы анализа, такие как

SPR, ELISA анализ связывания пептидов с рекомбинантным RHAMM белком *in vitro*. С этой целью получали рекомбинантный RHAMM-СТ белок.



**Рисунок 17** – Схема состава пептидов-лигандов: **а)** общая структура пептидов, используемых для исследования; **б)** структура пептидов, конъюгированных с N-ацетилцистеином; **с)** структура пептидов, конъюгированных с FITC.

**Таблица 5** – Анализ синтезированных пептидов с использованием ESI-MS и ВЭЖХ.

Аминокислотные последовательности	Фрагменты тубулина	Tun	Номер соединения	Теоретический M/Z	Наблюдаемый M/Z	Степень чистоты (%)
DSADGEDEGEEY	$\alpha$ Ia (438–449)	СТТ	1a	657,7 [M+2H] <sup>2+</sup>	658,2 [M+2H] <sup>2+</sup>	98
VEGEGEEEGEEY	$\alpha$ Ia (440–451)	СТТ	2a	677,7 [M+2H] <sup>2+</sup>	677,6 [M+2H] <sup>2+</sup>	98
			2b	807,3 [M+2H] <sup>2+</sup>	807,6 [M+2H] <sup>2+</sup>	98
			2c	928,8 [M+2H] <sup>2+</sup>	927,9 [M+2H] <sup>2+</sup>	98
SVEAEAEEGEEY	$\alpha$ IIIc (439–450)	СТТ	3a	670,8 [M+2H] <sup>2+</sup>	670,7 [M+2H] <sup>2+</sup>	97
			3b	800,3 [M+2H] <sup>2+</sup>	800,5 [M+2H] <sup>2+</sup>	98
			3c	921,8 [M+2H] <sup>2+</sup>	922,1 [M+2H] <sup>2+</sup>	98
IDSYEDEDEGEE	$\alpha$ IVa (437–448)	СТТ	4a	714,7 [M+2H] <sup>2+</sup>	715,2 [M+2H] <sup>2+</sup>	99
DSFEEENEGEEF	$\alpha$ VIII (438–449)	СТТ	5a	730,3 [M+2H] <sup>2+</sup>	730,8 [M+2H] <sup>2+</sup>	97
LEKDYEYVGVDS	$\alpha$ Ia (428–439)	H12	6a	691,3 [M+2H] <sup>2+</sup>	691,8 [M+2H] <sup>2+</sup>	99
GEFSEARDMAA	$\alpha$ Ia (416–427)	H12	7a	656,3 [M+2H] <sup>2+</sup>	656,5 [M+2H] <sup>2+</sup>	98
FVHWYVGEEMEE	$\alpha$ Ia (404–415)	H12	8a	741,3 [M+2H] <sup>2+</sup>	741,9 [M+2H] <sup>2+</sup>	99

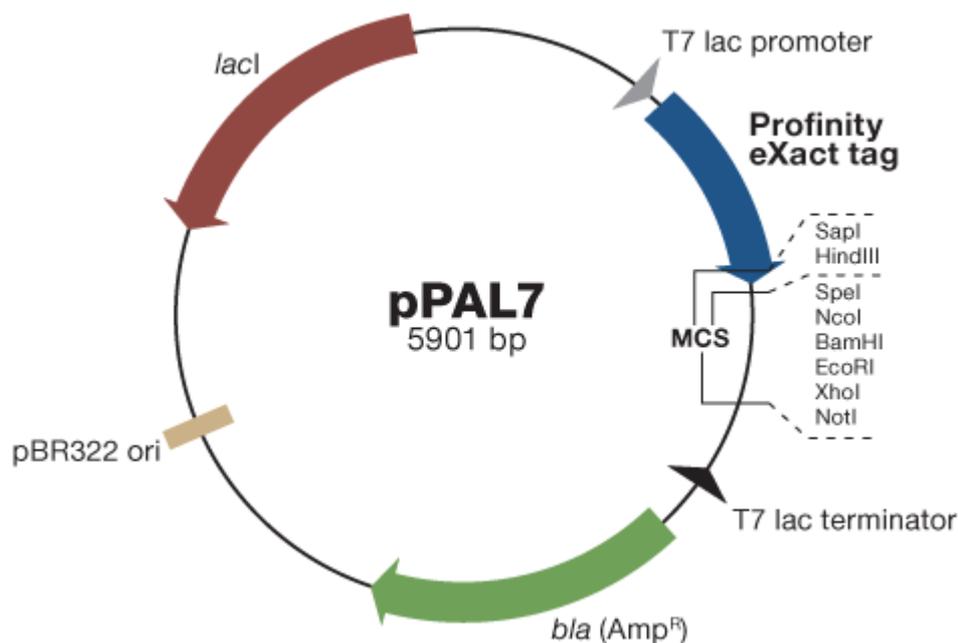
## Продолжение таблицы 5.

Аминокислотные последовательности	Фрагменты тубулина	Тип	Номер соединения	Теоретический M/Z	Наблюдаемый M/Z	Степень чистоты (%)
GEFEEEEGEDEA	$\beta$ IIa (434–445)	СТТ	9a	684,7 [M+2H] <sup>2+</sup>	685,2 [M+2H] <sup>2+</sup>	98
EEDFGEEAEEEE	$\beta$ Ia (433–444)	СТТ	10a	691,8 [M+2H] <sup>2+</sup>	691,9 [M+2H] <sup>2+</sup>	99
			10b	821,3 [M+2H] <sup>2+</sup>	821,7 [M+2H] <sup>2+</sup>	99
			10c	942,8 [M+2H] <sup>2+</sup>	943,1 [M+2H] <sup>2+</sup>	98
GEFEEEAEEVEA	$\beta$ IV (433–444)	СТТ	11a	683,7 [M+2H] <sup>2+</sup>	684,3 [M+2H] <sup>2+</sup>	97
			11b	813,3 [M+2H] <sup>2+</sup>	813,6 [M+2H] <sup>2+</sup>	97
			11c	934,8 [M+2H] <sup>2+</sup>	935,1 [M+2H] <sup>2+</sup>	96
EAFEDEEEEEIDG	$\beta$ VI (435–446)	СТТ	12a	706,8 [M+2H] <sup>2+</sup>	706,3 [M+2H] <sup>2+</sup>	99
			12b	835,3 [M+2H] <sup>2+</sup>	835,6 [M+2H] <sup>2+</sup>	99
			12c	956,8 [M+2H] <sup>2+</sup>	957,1 [M+2H] <sup>2+</sup>	98
SNMNDLVSEYQQ	$\beta$ IIIa (413–424)	H12	13a	714,4 [M+2H] <sup>2+</sup>	713,8 [M+2H] <sup>2+</sup>	99
RYQLHPYR	$\beta$ IIIa(425–432)	H12	13b	725,8 [M+2H] <sup>2+</sup>	726,9 [M+2H] <sup>2+</sup>	99
FTEAESNMNDLV	$\beta$ IIIa (408–419)	H12	14a	684,8 [M+2H] <sup>2+</sup>	685,2 [M+2H] <sup>2+</sup>	99
			14b	814,4 [M+2H] <sup>2+</sup>	813,8 [M+2H] <sup>2+</sup>	98
			14c	935,8 [M+2H] <sup>2+</sup>	936,1 [M+2H] <sup>2+</sup>	97
RPDYISWGTQEQ	$\gamma$ I (440–451)	СТТ	15a	740,4 [M+2H] <sup>2+</sup>	740,4 [M+2H] <sup>2+</sup>	98
VQQLIDEYHAAT	$\gamma$ I (428–439)	H12	16a	693,8 [M+2H] <sup>2+</sup>	693,2 [M+2H] <sup>2+</sup>	95
DNPDEMDTSREI	$\gamma$ I (416–427)	H12	17a	711,3 [M+2H] <sup>2+</sup>	711,4 [M+2H] <sup>2+</sup>	99
GEGEEGEE	$\alpha$ Ia (443–450)	СТТ	18	670,7 [M+2H] <sup>2+</sup>	670,6 [M+2H] <sup>2+</sup>	98
DFGEEAEE	$\beta$ Ia (435–442)	СТТ	19	690,8 [M+2H] <sup>2+</sup>	690,9 [M+2H] <sup>2+</sup>	99

В биологическом материале содержание RHAMM белка крайне низкое, поэтому разработка препаративных методов получения нативного RHAMM белка является нецелесообразной. В связи с этим получение RHAMM белка осуществлялось нами с помощью генно-инженерных методов. RHAMM белок содержит ГК-связывающий домен, который находится около карбоксильного конца (CT) и состоит из основных аминокислот, таких как лизин (Lys), аргинин (Arg) или лейцин (Leu). ГК-связывающий домен RHAMM-CT представляет собой основной “Leu-zipper” домен, который состоит из остатков основных аминокислот и не содержит кислых остатков (<sup>718</sup>LKQKIKHVVKLKDENSEQL KSEVSKLRSQ LVKRK<sup>750</sup>). Установлено, что взаимодействие ГК с RHAMM основано на ионных контактах между положительно заряженными остатками в белке и отрицательно заряженными карбоксильными группами на ГК, а также на гидрофобных взаимодействиях между липофильными участками RHAMM белка [214, 383, 430].

Для анализа специфичности связывания пептидов мы выделяли рекомбинантный белок RHAMM-CT (аа. 706–767, Мол.масса 7, 2 кДа, pI = 10,1) из *E.coli* BL21(DE3), несущей рекомбинантную плазмиду pPAL7-RHAMM-CT (Рисунок 18). В качестве источника гена RHAMM-

СТ была использована библиотека генов *Mus musculus* (house mice)[163]. Фрагмент гена RHAMM, соответствующий последовательности, кодирующей RHAMM-СТ (<sup>706</sup>RDSYAQLLGH QNLKQKIKHVVKLDENSQL KSEVSKLRSQ LVKRKQNELR LQGELDKLQI<sup>767</sup>) и несущий ГК-связывающий домен, был выделен методом амплификации. Затем RHAMM-СТ клонировали в вектор pPAL7 и экспрессировали в штамм *E. coli* BL21(DE3) (Рисунок 18).



**Рисунок 18** – Экспрессионный вектор pPAL7, который использовался для биосинтеза рекомбинантного RHAMM-СТ (аа. 706–767, Мол. масса 7, 2 кДа, pI = 10,1) в штамме-продуценте *E. coli* BL21(DE3). Адаптировано из: Ruan B. et al., 2004 [449].

Данный штамм *E. coli* BL21(DE3) обеспечивал высокий и стабильный уровень экспрессии рекомбинантного RHAMM-СТ белка. Синтез белка RHAMM-СТ проводили в *E. coli*, трансфицированном рекомбинантной плазмидой pPAL7 [449], в культуральной среде сначала без индуктора *lac*-промотора-изопропилтио-β-D-галактопиранозид (IPTG). По достижении оптической плотности ростовой среды OD<sub>600</sub> 0,4–0,6 к культуральной среде добавляли IPTG (конечная концентрация 2 мМ) и продолжали синтез RHAMM-СТ белка под контролем индуцированного *lac*-промотора [163]. Из бактерий *E. coli* BL21(DE3) получали лизаты в соответствии с протоколом, описанным в «Методах исследования» и далее очистку рекомбинантного белка RHAMM-СТ осуществляли методом аффинной хроматографии с помощью системы очистки Fusion-Tag Profinity eXact™ (BioRad, США) (Рисунок 19).

Данная система очистки использует иммобилизованную, специально сконструированную субтилизинпротеазу, которая распознает и специфично связывается ( $K_D < 100$  пМ) с небольшой N-концевой ко-экспрессированной аффинной меткой (tag-EEDKLFKAL) в fusion-RHAMM-СТ белке. Мутантная субтилизинпротеаза S189, функциональный лиганд, иммобилизованный на

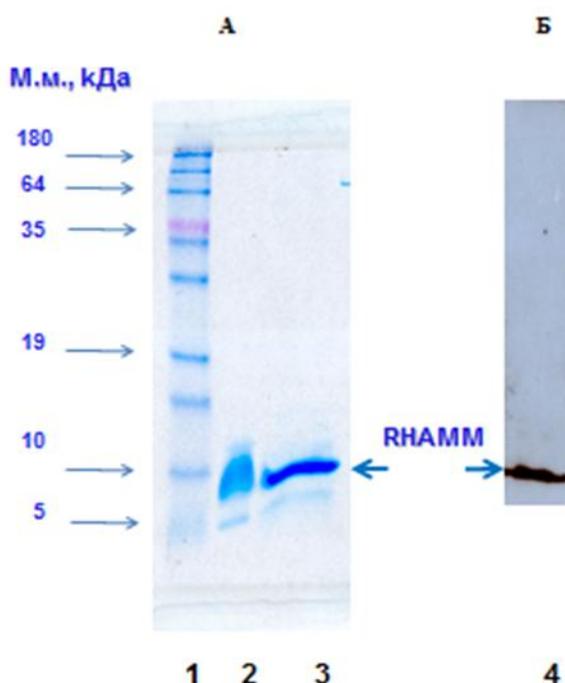
матрице, был специально разработан для аффинной хроматографии [82, 449]. Субтилизинпротеаза S189 является чрезвычайно стабильной и эффективно восстанавливается *in vitro*. На колонку, упакованную агарозой Superflow™, наносили лизат, полученный из *E. coli* BL21(DE3), при этом субтилизинпротеаза распознавала и связывала аффинно-меченый белок tag-RНАММ-СТ из смеси белков в лизате. Затем колонку промывали буфером для удаления неспецифично несвязанных белков. После этого через колонку пропускали фторид содержащий буфер (100 мМ фторид калия) для элюции. Фторид калия индуцировал субтилизинпротеазу, которая быстро и специфично отщепляла последовательность из девяти аминокислот (EEDKLFKAL) от RНАММ-СТ белка.



**Рисунок 19** – Схема стадий очистки RНАММ-СТ белка с помощью системы Fusion-Tag Profinity eXact™ (BioRad, США). Адаптировано из: Ruan B. et al., 2004 [449].

Таким образом, субтилизинпротеаза осуществляла специфичное расщепление и удаление метки из fusion-RНАММ-СТ белка непосредственно на колонке, что приводило к высвобождению высокоочищенного рекомбинантного RНАММ-СТ белка с нативной аминокислотной последовательностью.

Уровень продукции RНАММ-СТ в штамме *E. coli*, трансфицированном вектором pPAL7, составлял около 50 мг/л культуры. На Рисунке 20 представлены данные анализа рекомбинантного белка RНАММ-СТ (aa. 706–767, Мол. масса 7, 2 кДа, pI = 10,1) очищенного из *E. coli*. Степень чистоты выделенного белка проверяли методом одномерного электрофореза (10% SDS-ПААГ). Как видно из представленных данных, RНАММ-СТ представляет собой практически гомогенный белок (чистота более 90%) с Мол. массой ~ 7, 2 кДа, соответствующей массе RНАММ-СТ (Рисунок 20, А)[163]. Идентификацию RНАММ проводили с использованием моноклональных анти-RНАММ антител методом Вестерн-блот анализа (Рисунок 20, Б).



**Рисунок 20** – Анализ рекомбинантного белка RHAMM-CT методом 10% SDS-ПААГ электрофореза (А) и Вестерн блот анализа (Б). **1** – стандарты молекулярных масс; **2** – RHAMM-CT (6 мкг); **3** – RHAMM-CT (3 мкг); **4** – идентификация RHAMM-CT (3 мкг) с анти-RHAMM антителами.

### 3.2. Анализ специфичности связывания пептидов с RHAMM-CT

Специфичность связывания пептидов-лигандов с рецептором является необходимым условием для использования этих пептидов в лечении и диагностике раковых заболеваний. Поэтому на следующем этапе работы мы исследовали специфичность связывания полученных пептидов с RHAMM-CT.

#### 3.2.1. Анализ связывания пептидов-лигандов с RHAMM-CT с помощью поверхностного плазмонного резонанса

Поверхностный плазмонный резонанс (SPR) использовали для первоначальной идентификации пептидов, проявляющих сродство к RHAMM-CT [310]. Подробное описание SPR представлено в «Методах исследования». Вначале для того, чтобы определить условия для оптимальной иммобилизации RHAMM-CT с сенсорной пластиной, RHAMM-CT наносили на пластину при различных значениях pH. Плотность белка для каждой pH иммобилизации определяли из среднего ответа SPR шести измерений и показали, что максимальная иммобилизация происходила при pH = 9, 7 (Таблица 6).

Иммобилизация RHAMM был немного ниже при pH = 10, 1, вероятно, частично из-за потери заряда RHAMM в его изоэлектрической точке.

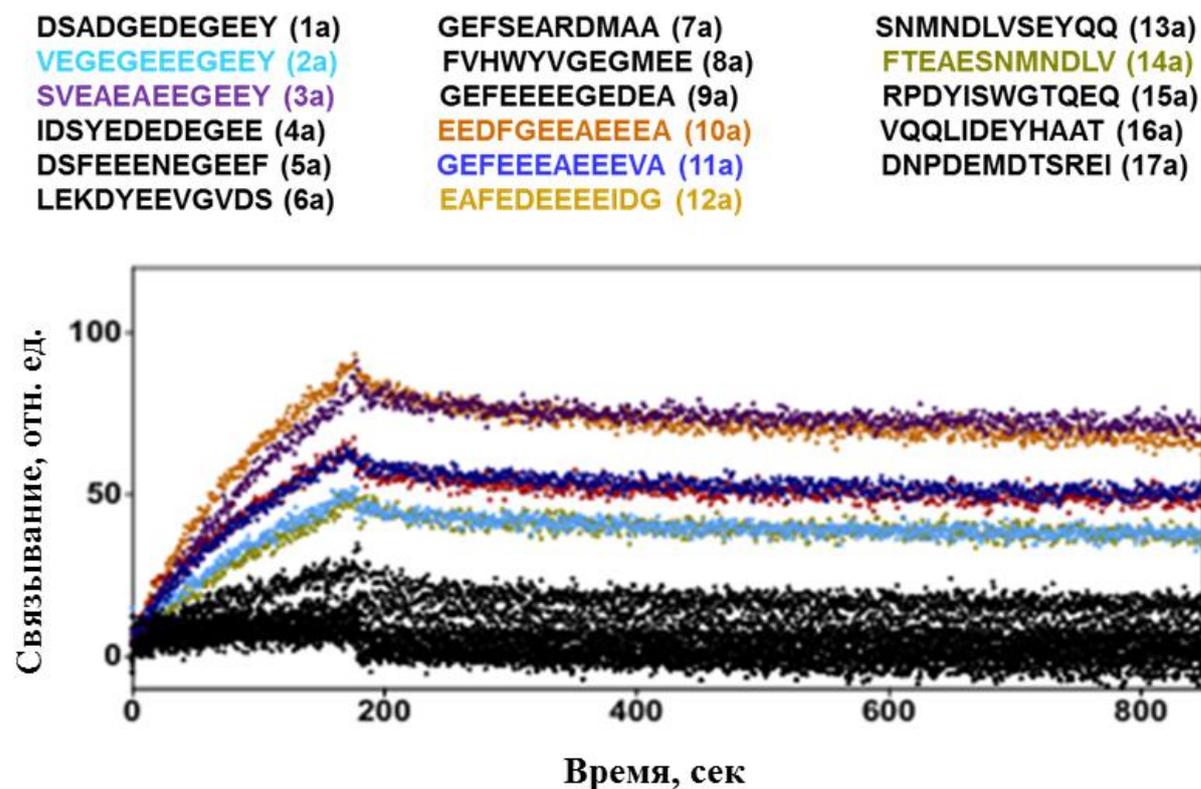
**Таблица 6** – Эффективность иммобилизации RHAMM-CT на сенсорной пластине SPR в зависимости от pH. Белок RHAMM-CT иммобилизовали с использованием бикарбонатного буфера (pH 7,0–10,1), при скорости потока 30 мкл/мин. Плотность лиганда определяли по среднему SPR-отклику шести измерений ( $\pm$  S.E.D). Белок связывали с сенсорной пластиной с использованием “cross”-сшивающих реагентов, EDAC (100 мМ) и сульфо-NHS (25 мМ).

<i>pH буфера</i>	<i>Концентрация RHAMM (мкг/мл)</i>	<i>Плотность лиганда (ед.)</i>
<b>10,1</b>	30	1445,1 $\pm$ 31,4
<b>9,7</b>	30	1547,8 $\pm$ 29,0
<b>9,1</b>	30	1499,5 $\pm$ 34,4
<b>7,0</b>	30	1475,4 $\pm$ 13,7
<b>9,7</b>	0	27,22 $\pm$ 3,57

Для анализа связывания пептидов с RHAMM, пептиды (10 мкМ) впрыскивали на сенсорные пластины, покрытые с RHAMM-CT (Рисунок 21). Сенсограммы из пластин, которые не содержали иммобилизованного RHAMM, использовали в качестве отрицательного контроля, и эти значения вычитали из полученных значений экспериментальных сенсограмм. Таким образом, мы идентифицировали пептиды-лиганды, взаимодействующие с RHAMM. Эти пептиды представлены на Рисунке 21: VEGEGEEEGEEY, SVEAEAEEGEEY, EEDFGEEAEAAA, GEFEEEAEEEA, EAFEDEEEEIDG и FTEAESNMNDLV.

На следующем этапе нашего исследования, мы использовали также метод поверхностного плазмонного резонанса. Однако в данном случае мы вначале наносили пептиды-лиганды на сенсорные пластины, а затем добавляли к ним рекомбинантный RHAMM-CT. После этого мы рассчитывали константы связывания пептидов с RHAMM-CT. Для этого пептиды модифицировали цистеином и ковалентно иммобилизовали на сенсорной пластине с помощью кросс-сшивающих реагентов EDAC (100 мМ) и сульфо-NHS (25 мМ). Затем различные концентрации RHAMM-CT (500, 750 и 1000 нМоль) добавляли к пептидам на поверхности сенсорной пластины и регистрировали спектры связывания белка с пептидами (Рисунок 22).

На Рисунке 22 представлены сенсограммы, показывающие специфичное взаимодействие исследуемых пептидов с RHAMM-CT. Эти результаты показали, что связывание RHAMM-CT с пептидами является дозо-зависимым и увеличивается с повышением концентрации белка. Сенсограммы связывания RHAMM-CT с пептидами соответствовали кинетической модели связывания Ленгмюра 1 : 1. На основании полученных данных были рассчитаны средние величины констант диссоциации ( $K_D$ ) для пептидов при различных концентрациях RHAMM-CT (Таблица 7).



**Рисунок 21** – Анализ пептидов-лигандов, связывающихся с RHAMM-CT. Сенсограммы получены при взаимодействии пептидов (концентрация 10 мкМ) с RHAMM-CT. В результате были выявлены пептиды (цветные линии, VEGEGEEEGEEY, SVEAEAEEGEEY, EEDFGEEAEAAA, GEFEEEAEEVA, EAFEDEEEIDG, FTEAESNMNDLV), которые продемонстрировали высокое сродство к RHAMM-CT (черные линии представляют собой пептиды с низким сродством).

Как видно из Таблицы 7, пептиды (VEGEGEEEGEEY,  $K_D = 24$  нМ), (EEDFGEEAEAAA,  $K_D = 32$  нМ), и (FTEAESNMNDLV,  $K_D = 30$  нМ) показали наиболее низкие константы диссоциации (в наномолярном диапазоне), что свидетельствует о высоком сродстве связывания этих пептидов с RHAMM-CT.

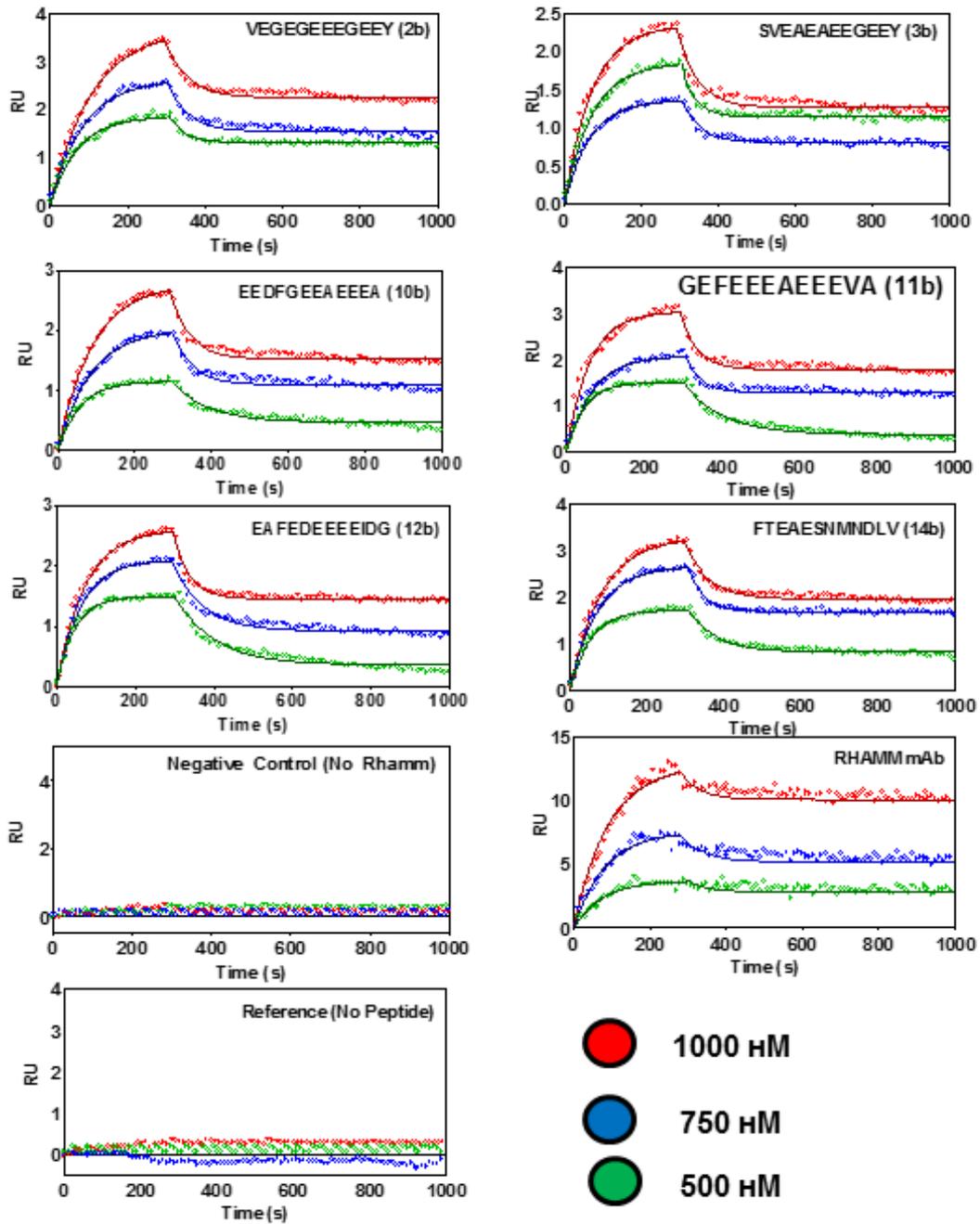
### 3.2.2. Анализ связывания FITC-пептидов с RHAMM-CT

Далее связывание пептидов-лигандов с рекомбинантным RHAMM-CT было проанализировано с помощью FITC-меченых пептидов методом ELISA (Рисунок 23).

Результаты показали, что пептиды (VEGEGEEEGEEY, EEDFGEEAEAAA и FTEAESNMNDLV) наиболее эффективно связывались с RHAMM-CT при концентрации 50 мМ.

### 3.2.3. Сравнительный анализ аминокислотной последовательности пептидов

Мы проводили сравнительный анализ аминокислотных последовательностей шести пептидов, которые связывались с RHAMM-CT, используя программы Cobalt Multiple Alignment Tool ([www.ncbi.nlm.nih.gov/protein](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein)) и ClustalX2 (США).



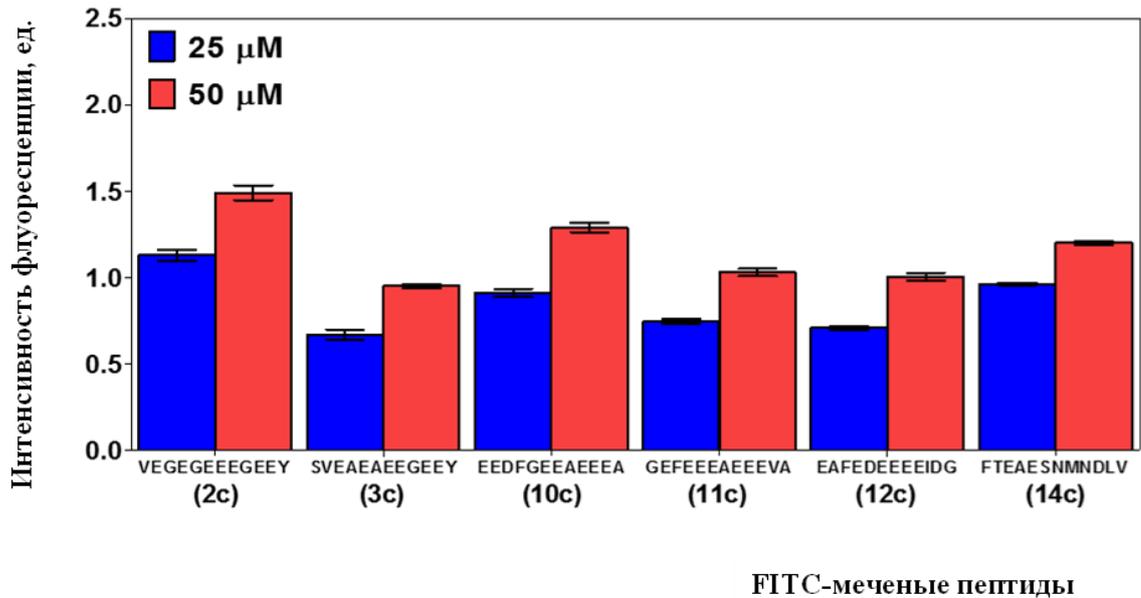
**Рисунок 22** – Кинетический профиль пептидов-лигандов, взаимодействующих с RHAMM-CT. Семь сенсограмм, показывающих связывание пептидов с RHAMM. Каждая сенсограмма соответствует ответам трех концентраций RHAMM (●1000 нМ, ●750 нМ и ●500 нМ), взаимодействующих с каждым из иммобилизованных пептидов (VEGEGEEEGEEY, SVEAEAEEGEEY, EEDFGEEA EEEA, GEFEEEA EEEVA, EAFEDEEEEIDG, FTEAESNMNDLV). При этом фоновое значение вычитали из полученных экспериментальных значений сенсограмм. В качестве отрицательного контроля использовали сенсорную пластину без добавления RHAMM-CT (отрицательный контроль, No RHAMM), а также контрольную пластину без добавления пептидов (Reference, No peptide). В качестве положительного контроля использовали пластину с моноклональными RHAMM-антителами (RHAMM mAb).

Таблица 7 – Определение величин  $K_{ON}$ ,  $K_{OFF}$  и  $K_D$  для пептидов-лигандов.

Аминокислотная последовательность	Концентрация нМоль	$k_{ON}$ (нМ сек <sup>-1</sup> )	$k_{OFF}$ (сек <sup>-1</sup> ) ( $10^{-3}$ )	$K_D$ нМ	Сред. $K_D$ нМ
SVEAEAEEGEEY	1000	1404	0,502	358,2	331,1±24,5
(3b)	750	1594	0,517	324,6	
	500	1620	0,503	310,4	
GEFEEEEAEVEA	1000	855	0,102	119,8	130±12,9
(11b)	750	1189	0,172	144,7	
	500	1485	0,187	126,0	
VEGEGEEEGEEY	1000	5046	0,124	24,5	24,2±0,4
(2b)	750	9371	0,224	23,8	
	500	9436	0,234	24,4	
EEEAEEEDFGEEA	1000	5347	0,173	32,4	32,6±1,1
(10b)	750	5808	0,196	33,8	
	500	7014	0,222	31,7	
EAFEEDEEEIDG	1000	1090	0,219	201,4	211,3±8,6
(12b)	750	1101	0,237	215,4	
	500	1594	0,346	217,0	
FTEAESNMNDLV	1000	3202	0,10	31,9	30,2±1,5
(14b)	750	4033	0,11	29,0	
	500	4189	0,12	29,6	
RHAMM-антитела	1000	37484	0,22	5,96	5,53±0,4
	750	42913	0,23	5,45	
	500	45172	0,23	5,18	

Сравнительный анализ показал, что из шести пептидов, четыре пептида (VEGEGEEEGEEY, EEDFGEEAEVEA, SVEAEAEEGEEY и GEFEEEEAEVEA) содержали в своем составе похожий фрагмент **EEHEEZ** (Рисунок 24).

Таким образом, сравнительный анализ показал, что пептиды-лиганды имеют в своем составе фрагмент **EEHEEZ**, который может быть областью связывания с RHAMM-CT. Кроме того, в связывании пептидов участвуют, по-видимому, конформационные, гидрофобные и водородные взаимодействия.



**Рисунок 23** – Анализ связывания FITC-меченых пептидов (VEGEGEEEGEEY, SVEAEAEEGEEY, EEDFGEEAEAAA, GEFEEEAEEVA, EAFEDEEEIDG, FTEAESNMNDLV) с RHAMM-CT. Исследование связывания FITC-пептидов с RHAMM-CT проводили при концентрации пептидов 25 μM и 50 μM. Отрицательный контроль (без иммобилизованного RHAMM), который показал минимальную фоновую флуоресценцию, вычитали для каждого измерения.



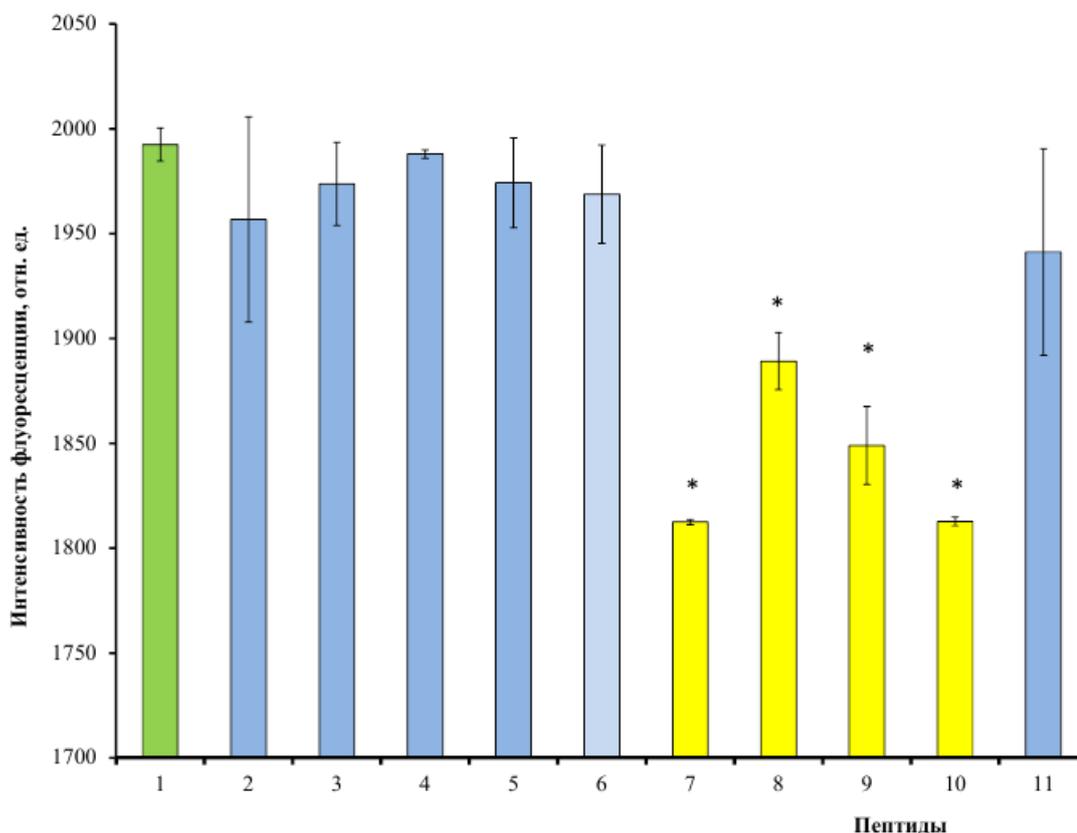
**Рисунок 24** – Аминокислотная последовательность RHAMM-CT. (А) Аминокислотные остатки, необходимые для связывания с ГК, выделены красным цветом (K – лизин, R – аргинин, H – гистидин). (Б) Аминокислотные последовательности пептидов-лигандов, содержащие похожий фрагмент **EEHEEZ**. Идентичные последовательности обозначены синим цветом (E – глутаминовая кислота) и подчеркнуты, в то время как полуконсервативные последовательности выделены желтым цветом (G – глицин, A – аспарагиновая кислота, Y – тирозин, E – глутаминовая кислота).

Мы предполагаем, что аминокислотные остатки глутаминовой кислоты (E) этого фрагмента способны связываться с основными остатками (лизин, аргинин, гистидин) RHAMM-CT за счет ионных взаимодействий. Следует отметить, что некоторые пептиды, представляющие аминокислотные остатки β-субъединицы тубулина (такие как FTEAESNMNDLV и RYQLHPYR), не содержат в своем составе фрагмент **EEHEEZ**. Однако эти пептиды также продемонстрировали высокое

средство связывания с RHAMM. Это указывает на то, что в связывании пептидов участвуют и другие типы взаимодействий (гидрофобные, водородные, Ван-дер-Ваальсовы).

### 3.2.4. Идентификация в составе пептидов аминокислот, необходимых для связывания с RHAMM-CT

Чтобы определить аминокислотные остатки, которые имеют решающее значение для взаимодействия пептидов с RHAMM-CT, мы проводили аланиновое сканирование пептидов EEDFGEEAEEEE, FTEAESNMNDLV и VEGEGEEEGEEY. Затем исследовали связывание пептидов, модифицированных аланином, с RHAMM-CT. Результаты аланинового сканирования пептида EEDFGEEAEEEE с RHAMM-CT показаны на Рисунке 25.



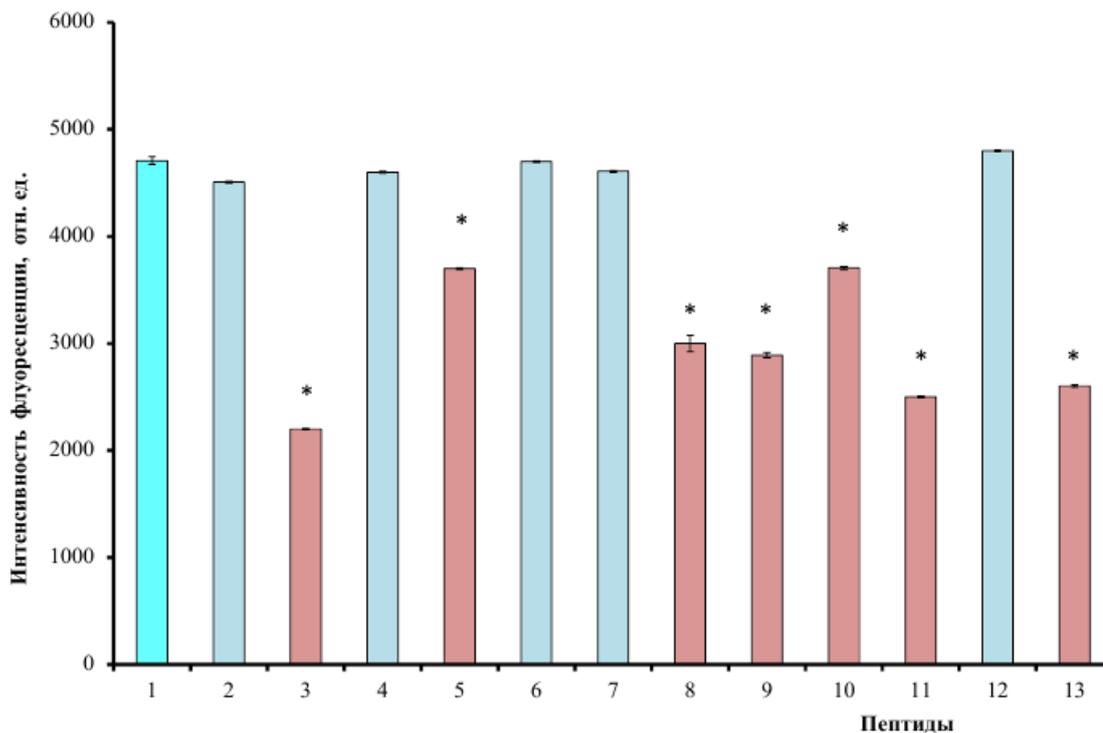
**Рисунок 25** – Аланиновое сканирование пептида EEDFGEEAEEEE, связывание с RHAMM-CT: 1 – EEDFGEEAEEEE (контроль, немодифицированный пептид), 2 – AEDFGEEAEEEE, 3 – EADFGEEAEEEE, 4 – EEAFGEEAEEEE, 5 – EEDAGEEAEEEE, 6 – EEDFAEEAEEEE, 7 – EEDFGAEAEEEE, 8 – EEDFGEEAEEEE, 9 – EEDFGEEAEEEE, 10 – EEDFGEEAEEEA, 11 – EEDFGEEAEEEA. Звездочки представляют собой последовательности, в которых Ala заменил ключевую аминокислоту.

Результаты сканирования аланином показали, что аминокислота E (глутаминовая кислота) в пептиде EEDFGEEAEEEE является необходимой для связывания с RHAMM-CT.

Затем мы проводили аланиновое сканирование пептида VEGEGEEEGEEY (Рисунок 26).

Результаты показали, что аминокислоты E (глутаминовая кислота), G (глицин), Y (тирозин) в составе пептида VEGEGEEEGEEY необходимы для связывания с RHAMM-CT, поскольку их замена на аминокислоту Ala (аланин) приводила к значительному снижению

сродства пептидов к белку. Следует отметить, что эти аминокислоты являются частью фрагмента EEXEEZ, что подтверждает его важность для связывания на ГК-центре RHAMM.



**Рисунок 26** – Аланиновое сканирование пептида VEGEGEEEGEEY, связывание с RHAMM-CT: 1 – VEGEGEEEGEEY (контроль, немодифицированный пептид), 2 – AEGEGEEEGEEY, 3 – VAGEGEEEGEEY, 4 – VEAEGEEEGEEY, 5 – VEGAGEEEEGEEY, 6 – VEGEAEEEGEEY, 7 – VEGEGAEEEGEEY, 8 – VEGEGEAEGEEY, 9 – VEGEGEEAGEEY, 10 – VEGEGEEEAEEY, 11 – VEGEGEEEGAEY, 12 – VEGEGEEEGEAY, 13 – VEGEGEEEGEEA. Звездочки представляют собой последовательности, в которых Ala заменил ключевую аминокислоту.

Анализ аланинового сканирования пептида FTEAESNMNDLV показал, что аминокислоты D (аспарагиновая кислота), N (аспарагин), S (серин), E (глутаминовая кислота) и T (треонин) являются ключевыми аминокислотами для связывания с RHAMM-CT (Рисунок 27).

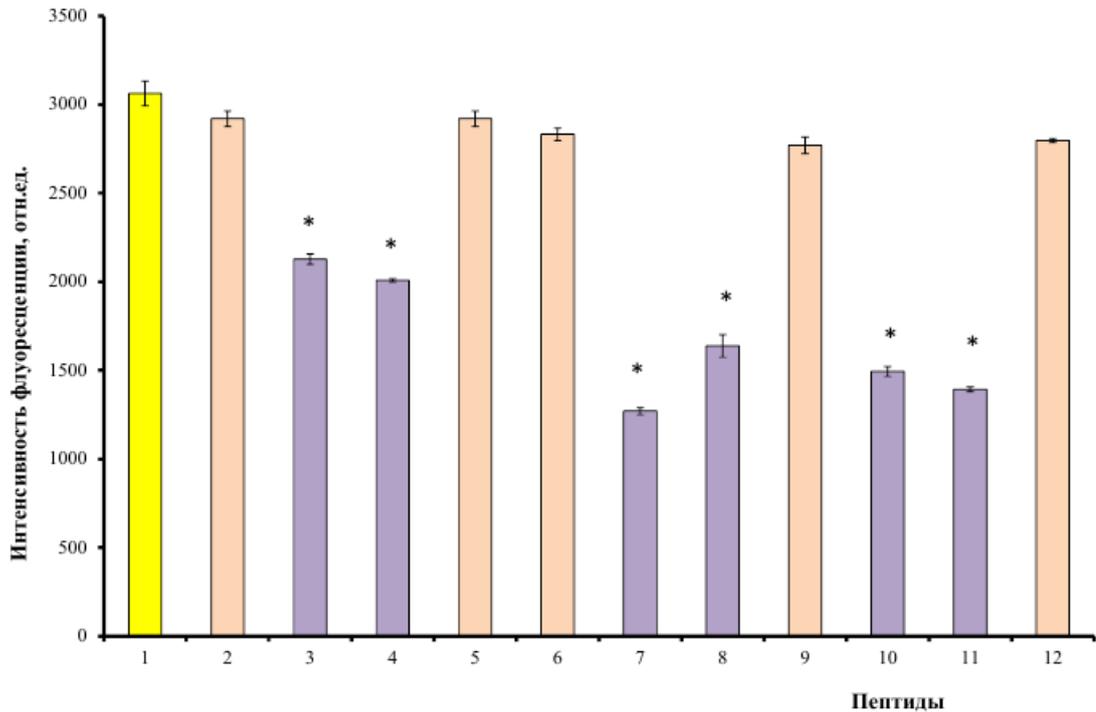
На основе данных сканирования аланина были разработаны укороченные версии пептидов (EEDFGEEAEEEA и VEGEGEEEGEEY), содержащие ключевые аминокислоты, показанные на Рисунках 25 и 26. Эти укороченные 8-мерные пептиды (DFGEEAEE и GEGEEGEE) были также использованы в последующих экспериментах для исследования специфичности связывания с RHAMM рецептором.

### 3.2.5. Анализ конкурентного связывания FITC-пептидов на ГК-связывающем центре RHAMM-CT

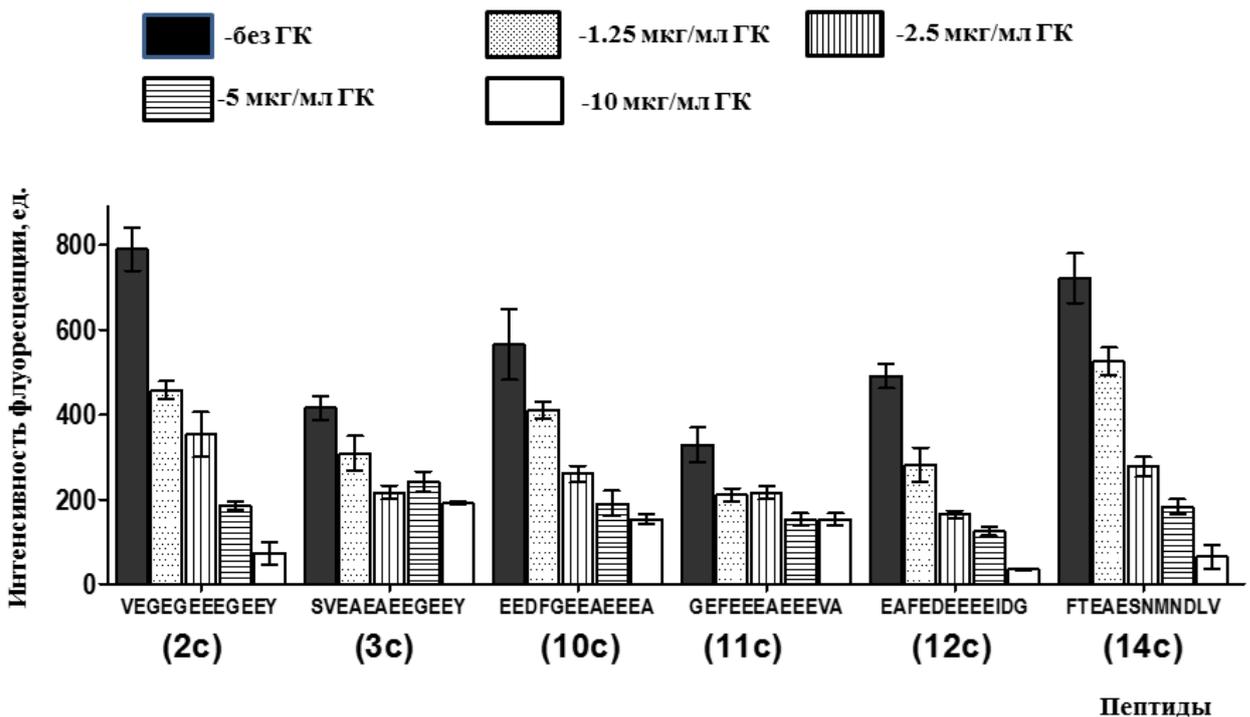
Пептиды оценивали на предмет их способности конкурировать с ГК за центр связывания на RHAMM-CT с использованием метода ELISA (Рисунок 28).

Рекомбинантный RHAMM-CT иммобилизовали на планшете и добавляли к нему флуоресцеин-меченые пептиды. Затем добавляли различные концентрации немеченой ГК (1,25; 2,5;

5 и 10 мкг/мл). Результаты показали, что возрастающие концентрации ГК замещают FITC-пептиды на ГК-связывающем центре. Это свидетельствует о том, что ГК и пептиды конкурируют за связывание с RHAMM-СТ. Следует отметить, что наиболее эффективно конкурировали с ГК пептиды VEGEGEEEEGEY, EEEAEEDFGEEA и FTEAESNMNDLV.

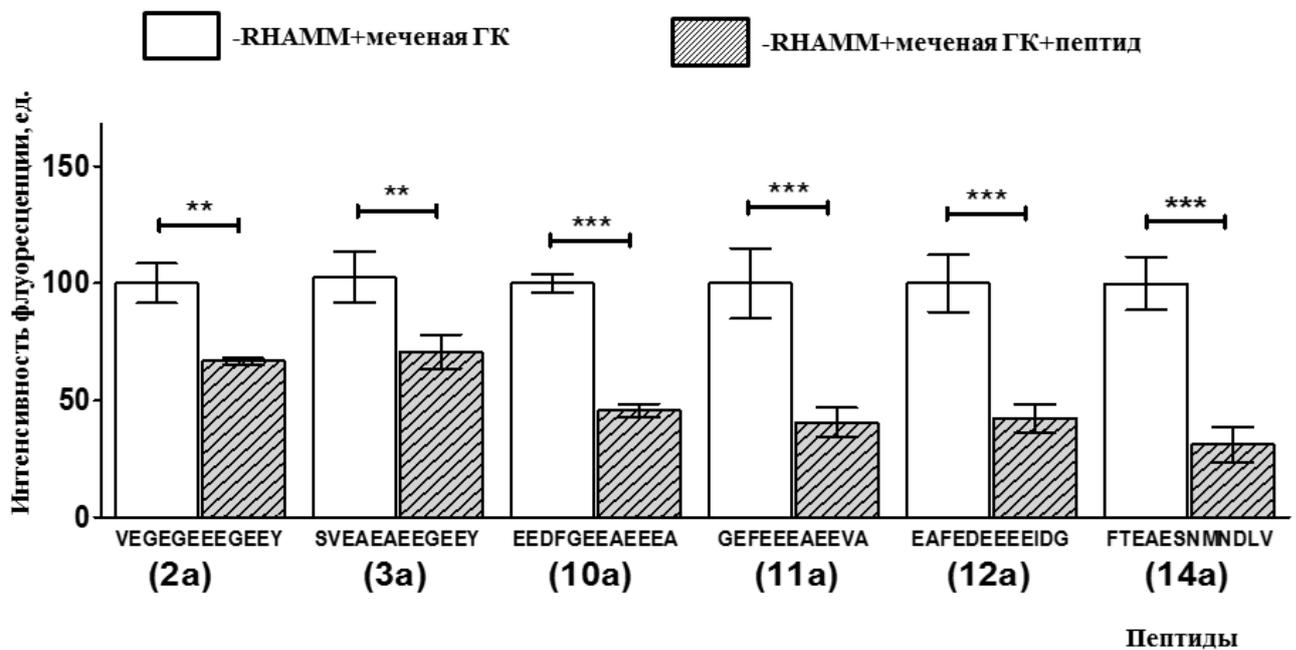


**Рисунок 27** – Аланиновое сканирование пептида FTEAESNMNDLV, связывание с RHAMM-СТ: 1 – FTEAESNMNDLV (контроль, немодифицированный пептид), 2 – FTEAESNMNDLV, 3 – FTEAESNMNALV, 4 – FTEAESNMADLV, 5 – FTEAESNANDLV, 6 – FTEAESAMNDLV, 7 – FTEAEANMNDLV, 8 – FTEAASNNDLV, 9 – FTEAESNMNDLV, 10 – FTEAESNMNDLV, 11 – FTEAESNMNDLV, 12 – FTEAESNMNDLV. Звездочки представляют собой последовательности, в которых Ala заменил ключевую аминокислоту.



**Рисунок 28** – Конкурентное замещение FITC-пептидов гиалуроновой кислотой на ГК-связывающем центре RHAMM-CT. Используемая концентрация пептидов (10 мкг/мл).

На следующем этапе мы продолжили исследование связывания пептидов на ГК-связывающем центре RHAMM-CT. Однако в этом эксперименте мы использовали немеченые пептиды, а ГК метили флуоресцентным красителем Alexa Fluor 647 (Рисунок 29). Результаты показали, что пептиды конкурентно замещали ГК на ГК-связывающем центре RHAMM-CT. При этом пептиды EEEAEEDFGEEA, GEFEEEEAEVEA и FTEAESNMNDLV наиболее эффективно конкурировали с ГК.



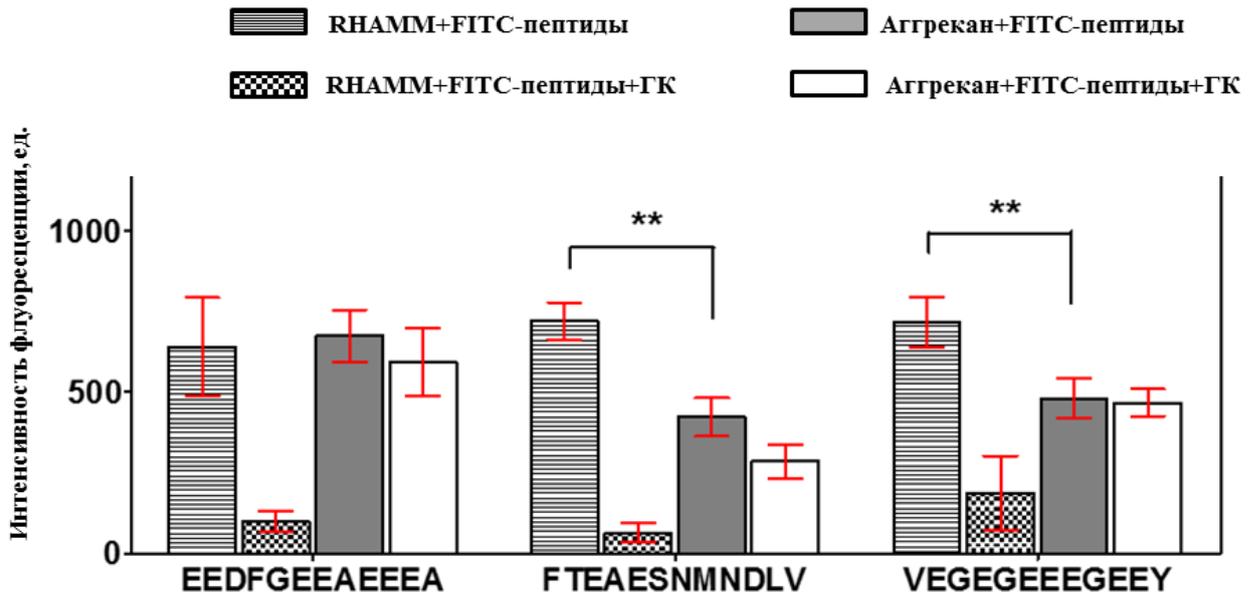
**Рисунок 29** – Конкурентное замещение ГК-Alexa Fluor 647 пептидами. Используемая концентрация пептидов (10 мкг/мл) и ГК (10 мкг/мл). \*\*  $p \leq 0,005$ , \*\*\*  $p \leq 0,0005$  по отношению к RHAMM-CT + меченая ГК.

### 3.2.6. Анализ связывания гликозаминогликанов на ГК-связывающем центре RHAMM-CT

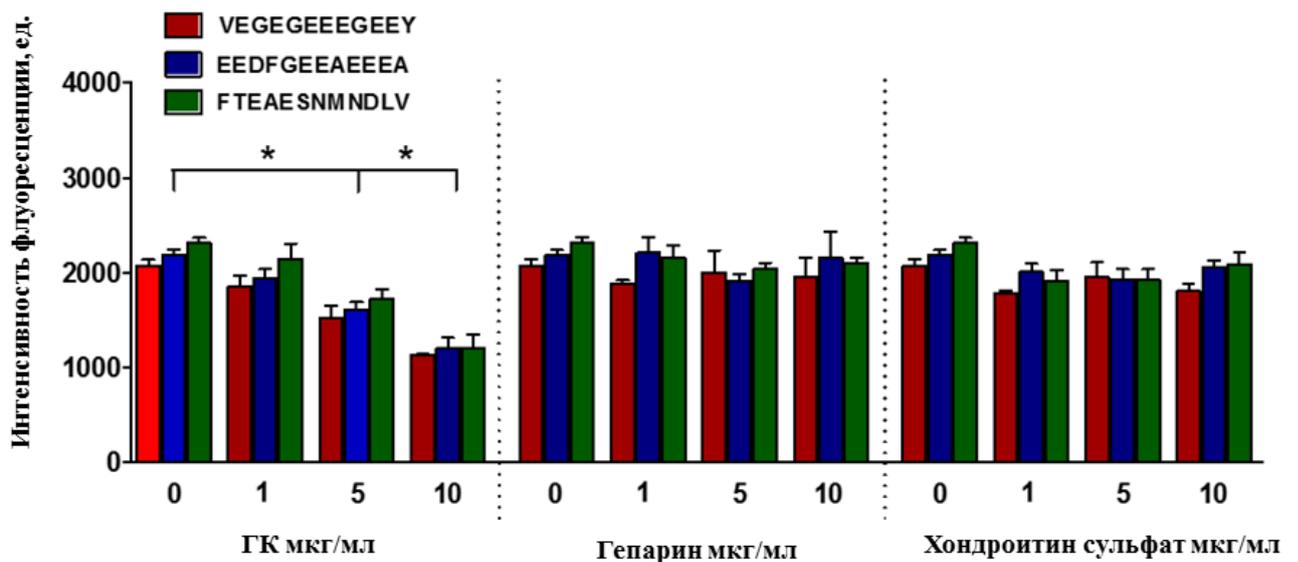
Чтобы подтвердить связывание пептидов на ГК-связывающем центре RHAMM-CT, мы также исследовали связывание пептидов в присутствии других гликозаминогликанов, таких как агрекан, гепарин и хондроитин сульфат (Рисунки 30, 31). Как видно из Рисунка 30, агрекан не способен вытеснять пептиды из ГК-центра связывания. Также на Рисунке 31 показано, что гепарин и хондроитин сульфат при различных концентрациях (1,5 и 10 мкг/мл) не конкурируют с пептидами за связывание с ГК-связывающим центром на RHAMM-CT. Только добавление ГК приводит к замещению пептидов на ГК-связывающем центре RHAMM-CT. Таким образом, результаты показали, что полученные пептиды специфично связываются на ГК-связывающем центре RHAMM-CT.

### 3.2.7. Анализ связывания пептидов с CD44 и RHAMM-CT

Кроме RHAMM имеется ряд белков, которые также связывают ГК, и наиболее хорошо охарактеризованным из них является рецептор CD44, содержащий ГК-связывающий модуль [416]. Однако взаимодействия ГК с RHAMM отличаются от взаимодействий ГК с CD44 тем, что связывание ГК с RHAMM основано в большей степени на ионных взаимодействиях. В то же время связывание ГК с CD44 происходит в основном через дисульфидные связи, а также водородные и гидрофобные [416].

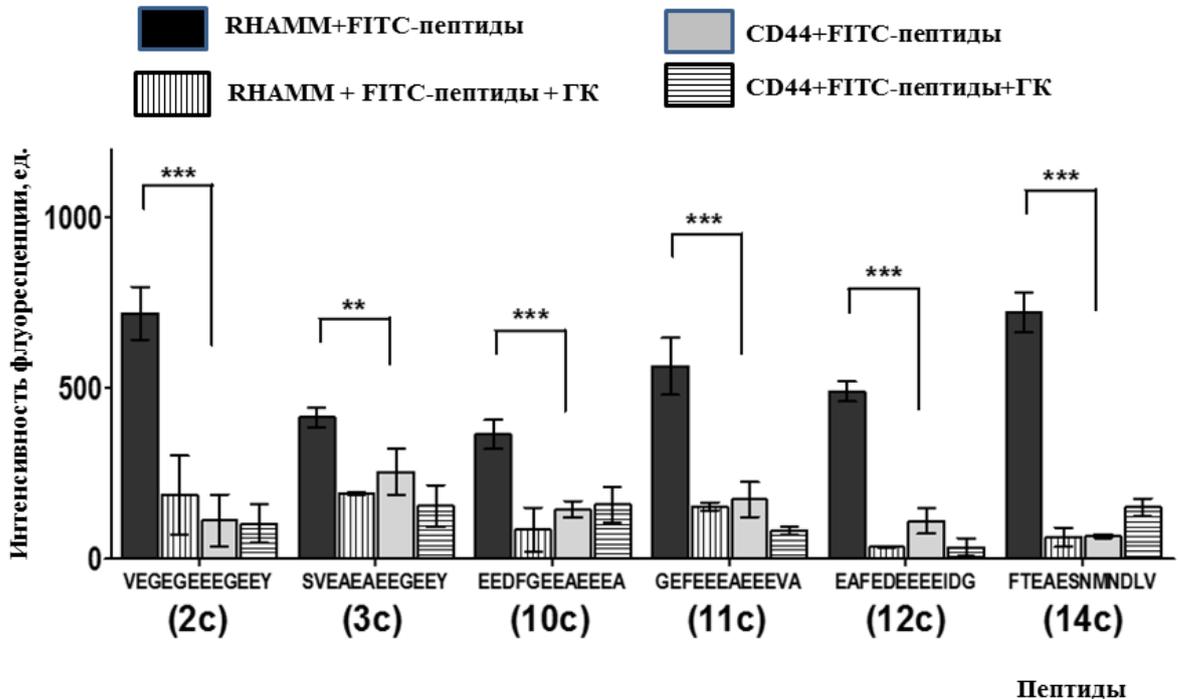


**Рисунок 30** – Анализ связывания пептидов на ГК-связывающем центре RHAMM-СТ в присутствии агрекана и ГК. \*\*  $p \leq 0,005$  по отношению к RHAMM-СТ + FITC-пептиды.



**Рисунок 31** – Анализ связывания пептидов на ГК-связывающем центре RHAMM-СТ в присутствии гепарина, хондроитин сульфата и ГК. \*  $p \leq 0,05$  по отношению к RHAMM-СТ + FITC-пептиды

Чтобы определить, способны ли пептиды-лиганды также связываться с CD44, мы исследовали связывание пептидов с RHAMM-СТ и ГК-связывающим модулем CD44, используя метод ELISA (Рисунок 32). Для этих экспериментов RHAMM-СТ или CD44 наносили на планшеты, затем добавляли к ним либо FITC-пептиды, либо FITC-пептиды и ГК. Далее определяли связывание FITC-пептидов по интенсивности флуоресценции.



**Рисунок 32** – Анализ связывания FITC-пептидов (VEGEGEEEGEEY, SVEAEAEEGEEY, EEDFGEEAEAAA, GEFEEEAEEVA, EAFEDEEEIDG, FTEAESNMNDLV) с CD44 или RHAMM-СТ. Отрицательный контроль (без иммобилизации RHAMM или CD44) вычитали для каждого измерения. Используемая концентрация пептидов (10 мкг/мл) и ГК (10 мкг/мл). \*  $p \leq 0,005$ , \*\*\*  $p \leq 0,0005$  по отношению к RHAMM-СТ + FITC-пептиды.

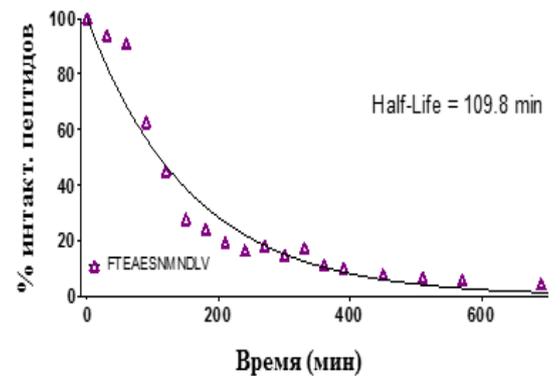
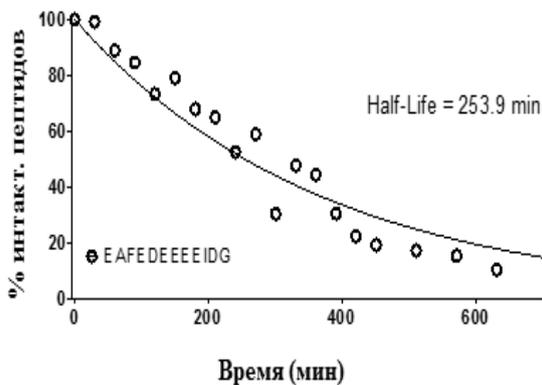
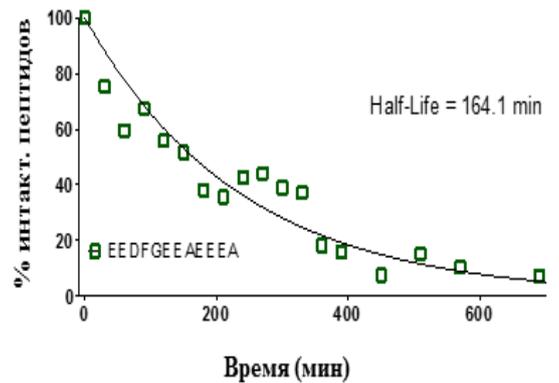
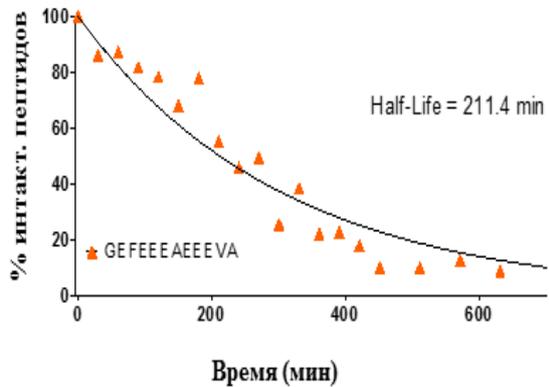
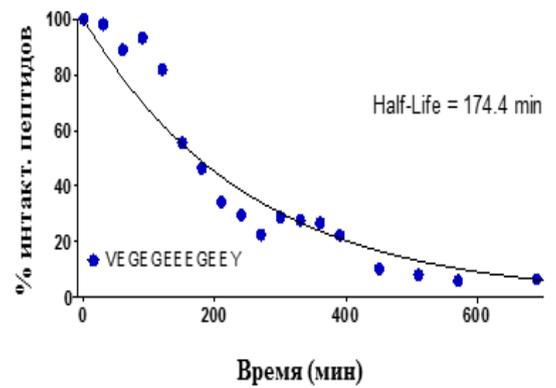
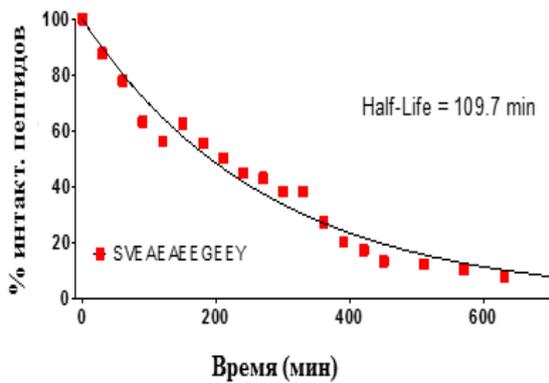
Результаты показали, что FITC-пептиды связывались с RHAMM-СТ и конкурировали за центр связывания с ГК. Как видно из Рисунка 32, FITC-пептиды также связывались с CD44, однако, интенсивность связывания была в 6-8 раза ниже, чем для RHAMM-СТ. Следует отметить, что добавление ГК к этим образцам практически не влияло на интенсивность флуоресценции и только два пептида конкурировали с ГК за центр связывания на CD44 (EAFEDEEEIDG и GEFEEEAEEVA).

Таким образом, мы показали, что связывание пептидов к RHAMM-СТ характеризуется большим сродством, чем к CD44.

### 3.2.8. Анализ стабильности пептидов

Стабильность пептидов в кровотоке и достаточно быстрое выведение их из организма являются необходимым условием для применения пептидов с целью визуализации и терапии ра-

ка. Поэтому в следующей части работы мы исследовали стабильность и период полураспада синтезированных пептидов (VEGEGEEEGEEY, SVEAEAEEGEEY, EEDFGEEAEAAA, GEFEEEEAEAAA, EAFEDEEEEIDG, FTEAESNMNDLV) в сыворотке крови. Стабильность каждого пептида в сыворотке *in vitro* оценивали в течение 11 часов, и количественное определение оставшегося интактного пептида определяли с помощью ВЭЖХ. Для анализа пептиды добавляли в эмбриональную бычью сыворотку при 37°C и отбирали аликвоты с 30-минутными интервалами. В каждой точке реакцию останавливали осаждением сывороточного белка трифторуксусной кислотой, и растворы центрифугировали для дальнейшего анализа пептидов. Пептиды демонстрировали стабильность в сыворотке с приемлемым временем полураспада примерно 2–4 часа (Рисунок 33). Процент интактных пептидов с 30-минутными интервалами в течение 11 часов представляли как функцию времени.



**Рисунок 33** – Исследование стабильности шести пептидов (VEGEGEEEEGEEY, SVEAEAEEGEEY, EEDFGEEAEAAA, GEFEEEEAEAAVA, EAFEDAAAAIDG, FTEAESNMNDLV) в физиологических условиях в эмбриональной бычьей сыворотке.

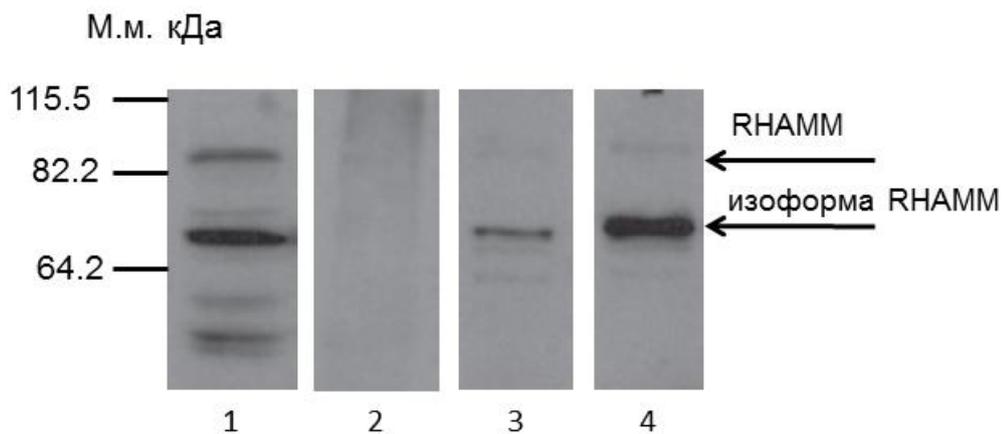
Таким образом, результаты показали, что пептиды являются достаточно стабильными и имеют приемлемое время полураспада, необходимое для визуализации раковых клеток и воздействия на их метаболизм.

### 3.2.9. Анализ связывания RНАММ с ГК

Мы исследовали связывание RНАММ с высокомолекулярной ГК (Мол. масса 220 кДа) и низкомолекулярной ГК (Мол. масса 10 кДа) методом иммунопреципитации, как описано в «Методах исследования» [533].

Для этого лизаты из фибробластов (LR21), сверхэкспрессирующие RНАММ, инкубировали с ГК (220 кДа или 10 кДа), конъюгированной с сефарозой.

Результаты показали, что RНАММ связывается как с ГК (220 кДа), так и с ГК (10 кДа) (Рисунок 34).



**Рисунок 34** – Связывание RНАММ с ГК (220 и 10 кДа): 1 – лизат фибробластов RНАММ, 2 – контроль (сефароза), 3 – лизат + ГК (220 кДа), 4 – лизат + ГК (10 кДа).

Однако, сродство связывания RНАММ с фрагментами ГК (10 кДа) было значительно выше, чем для ГК (220 кДа). В совокупности эти результаты показали, что RНАММ предпочтительно связывается с низкомолекулярными олигосахаридами ГК. На основании этого, мы предположили, что 12-мерные пептиды будут связываться с нативным RНАММ.

### 3.2.10. Исследование связывания ГК-Texas Red и FITC-пептидов с клетками

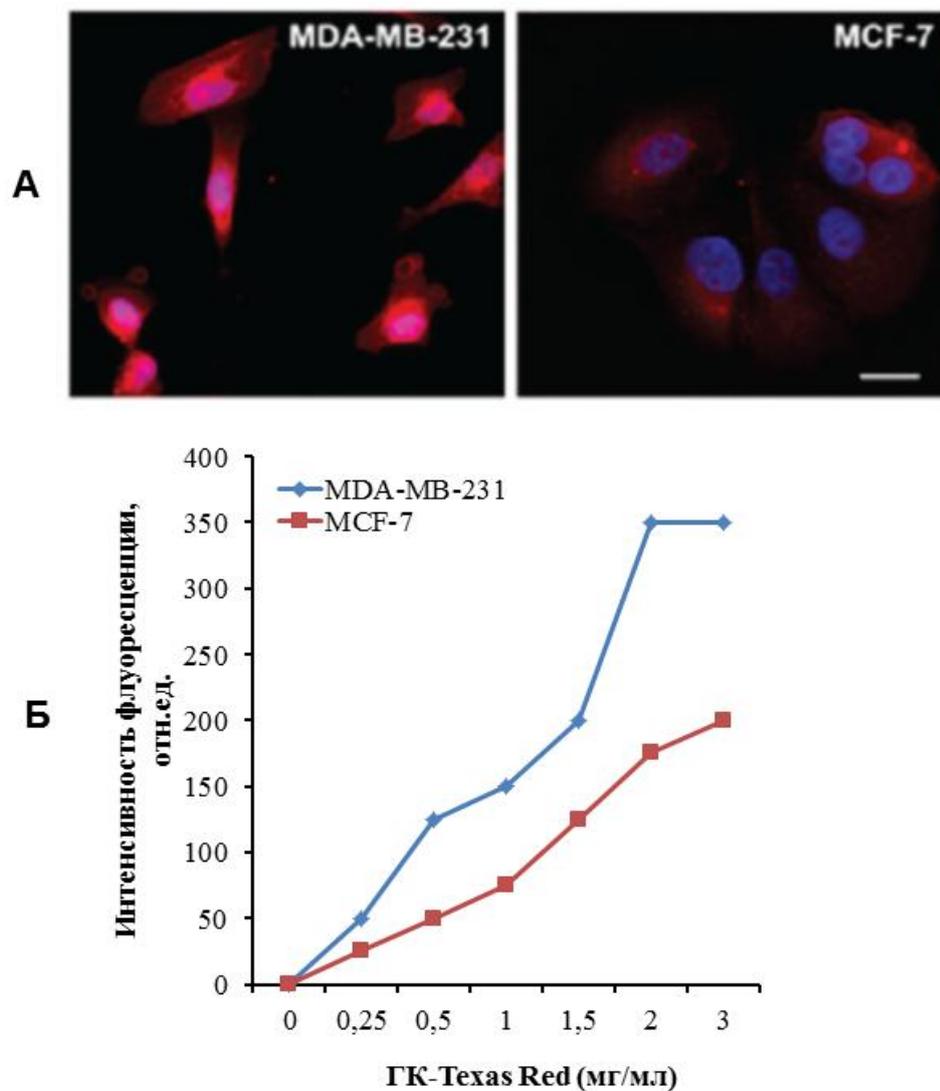
Разработка визуализирующих зондов, способных отслеживать процесс возникновения и развития рака, может улучшить диагностику и лечение раковых заболеваний, особенно, если зонды смогут обнаруживать болезнь на ранних стадиях. Каждый метод визуализации имеет

свои уникальные особенности и преимущества. Вначале мы использовали флуоресцентно-меченую ГК-Texas Red, чтобы оценить ее возможности для визуализации опухолевых клеток. После этого мы исследовали связывание FITC-пептидов с поверхностью раковых и нормальных клеток.

### 3.2.11. Связывание ГК-Texas Red с поверхностью клеток РМЖ

Мы использовали агрессивные, опухолевые клетки MDA-MB-231, которые демонстрировали высокий уровень экспрессии RHAMM и CD44, а также менее агрессивные клетки MCF-7, которые показали более низкие уровни экспрессии RHAMM и CD44 [562].

Результаты показали, что клетки MDA-MB-231 связывали ГК-Texas Red более интенсивно, чем клетки MCF-7 (Рисунок 35, А, Б)[562].



**Рисунок 35** – Связывание ГК-Texas Red с поверхностью клеток РМЖ: А – клетки MDA-MB-231, Б – клетки MCF-7 (шкала = 10 мкм).

Это свидетельствует о том, что ГК целенаправленно связывается с опухолевыми клетками, характеризующимися высоким уровнем экспрессии гиалуроновых рецепторов. Благодаря тому, что ГК является биосовместимой, гидрофильной и анионной, возможно разрабатывать на ее основе молекулярные зонды для визуализации опухолевых клеток.

### ***3.2.12. Связывание FITC-пептидов с поверхностью клеток рака молочной железы***

Для применения пептидов в качестве тераностиков необходимо было показать специфичность взаимодействия пептидов именно с опухолевыми клетками.

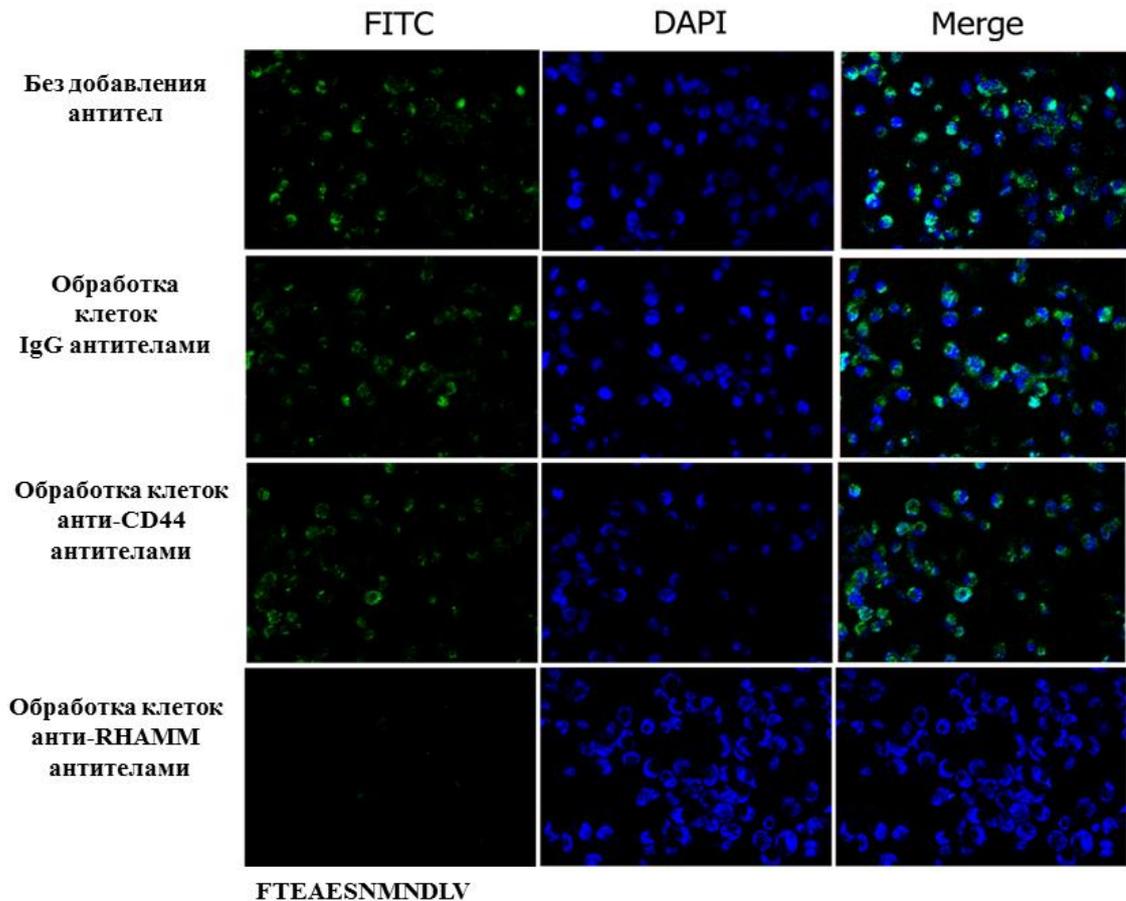
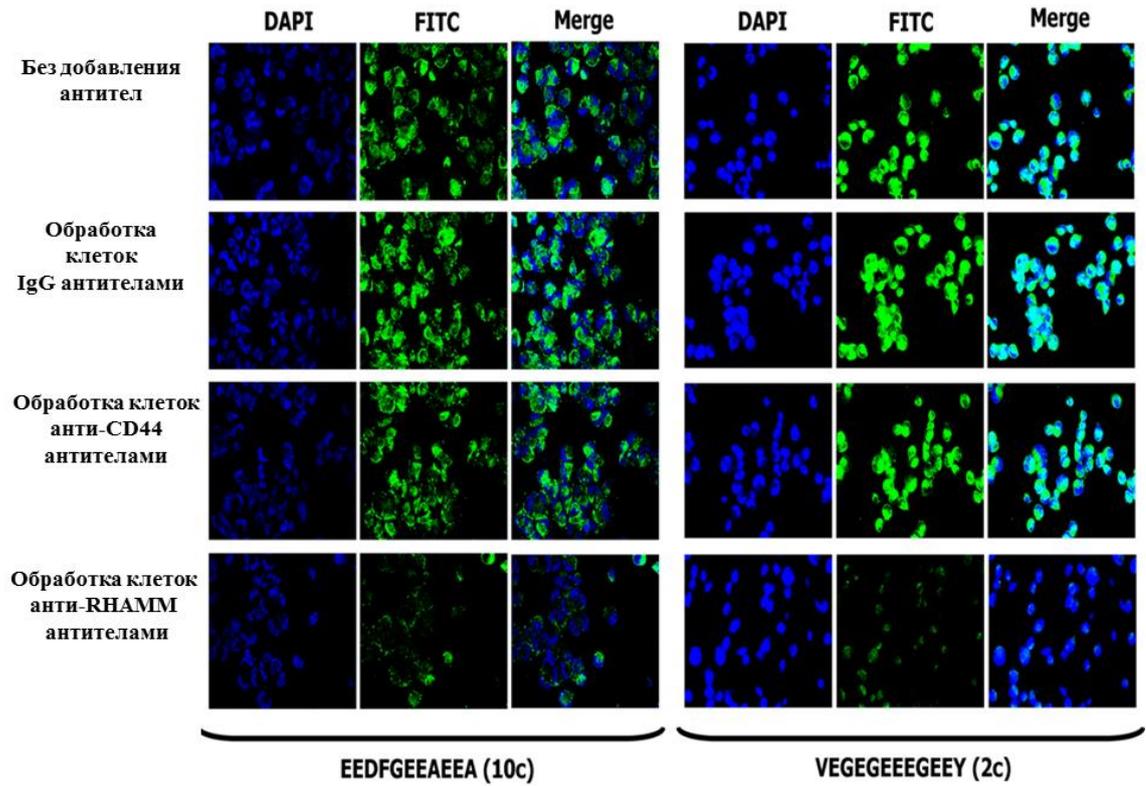
Чтобы определить, способны ли пептиды взаимодействовать с RНАММ и CD44 рецепторами, расположенными на поверхности интактных клеток, мы исследовали связывание FITC-пептидов с опухолевыми клетками человека методом конфокальной флуоресцентной микроскопии [163]. Для экспериментов мы использовали клетки рака молочной железы (MDA-MB-231) и клетки рака предстательной железы (PC3m-LN4), которые, как известно, сверхэкспрессируют RНАММ, CD44 и ГК [73, 217, 365]. Ранее было показано, что эти клетки также связывают флуоресцентно-меченую ГК [561, 562]. Для этого исследования мы выбрали FITC-пептиды (EEDFGEEAEAAA, VEGEGEEEGEEY и FTEAESNMNDLV), которые продемонстрировали ранее высокое сродство и специфичность связывания с RНАММ-СТ [163].

Клетки предварительно инкубировали с анти-IgG, анти-CD44 или анти-RНАММ антителами, а затем к ним добавляли FITC-пептиды. Клетки, которые не обрабатывались антителами, показали интенсивную флуоресценцию, что указывало на связывание FITC-пептидов с поверхностью клеток (Рисунок 36, ряд 1-й, сверху). Предварительная инкубация клеток с анти-IgG антителами, которые взаимодействуют с рецептором FcR и не связываются с RНАММ [16], не приводила к заметному изменению флуоресценции. Это свидетельствует о том, что блокирование рецептора FcR не влияет на связывание FITC-пептидов [16] с поверхностью клеток (Рисунок 36, 2-й ряд сверху). Следует отметить, что клетки, обработанные анти-CD44 антителами (Рисунок 36, ряд 3), также показали достаточно интенсивную флуоресценцию. Это свидетельствует о том, что блокирование CD44 не влияет на связывание FITC-пептидов с клетками.

Как видно на Рисунке 36 (ряд 4-й), значительное снижение флуоресценции наблюдалось только в том случае, когда клетки обрабатывали анти-RНАММ антителами, которые блокировали связывание FITC-пептидов с RНАММ.

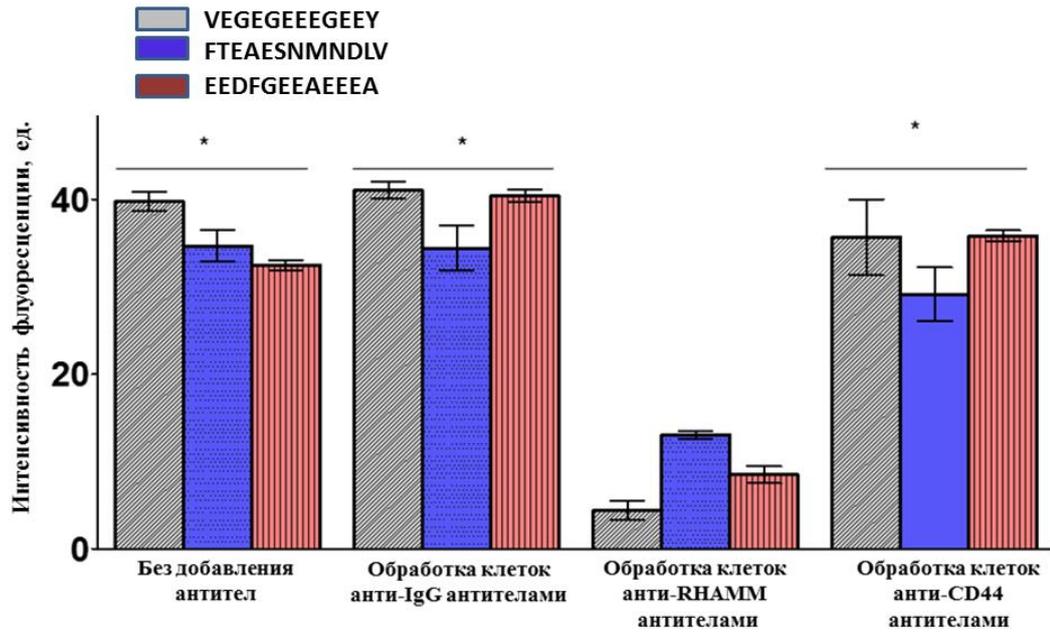
Таким образом, результаты показали, что FITC-пептиды специфично связывались с RНАММ на поверхности клеток рака молочной железы [1].

Количественный анализ связывания FITC-пептидов с поверхностью клеток MDA-MB-231 проводили с использованием программы ImageJ (Рисунок 37).



**Рисунок 36** – Визуализация связывания FITC-пептидов (EEDFGEEAEEEA, VEGEGEEEGEEY и FTEAESNMNDLV) с клетками рака молочной железы. Ядра окрашены синим цветом (DAPI), а FITC-пептиды окрашены зеленым цветом (FITC). Клетки, необработанные антителами, и клет-

ки, обработанные анти-IgG антителами, использовали в качестве положительного контроля для сравнения.



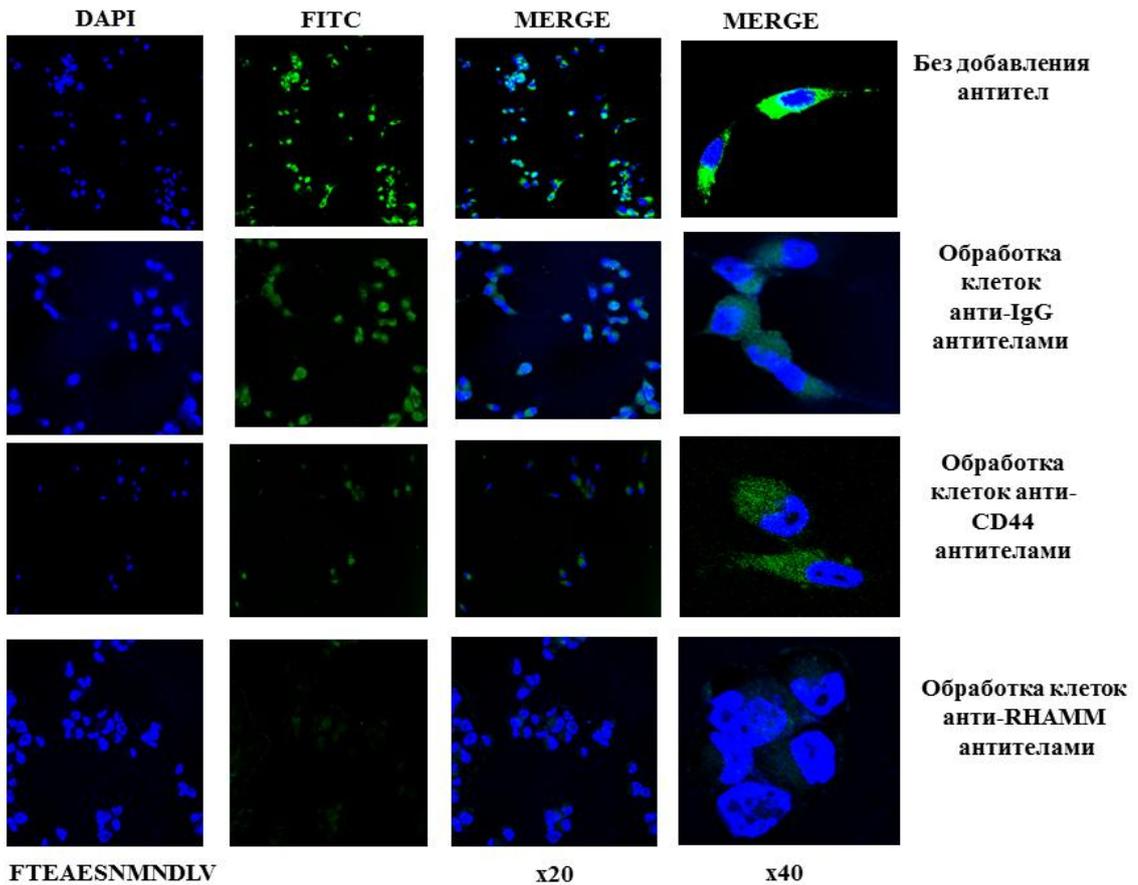
**Рисунок 37** – Количественная оценка связывания FITC-пептидов с клетками MDA-MB-231. Используя программное обеспечение ImageJ, были выбраны области интереса (ROI), общее количество проанализированных клеток составило 6 150,  $n = 3$ . Среднее значение флуоресценции каждого ROI была получено с использованием 8-битных изображений и представлено в виде гистограммы. \*  $p \leq 0,05$  по отношению к клеткам, обработанным анти-RHAMM антителами.

### 3.2.13. Связывание FITC-пептидов с поверхностью клеток рака предстательной железы

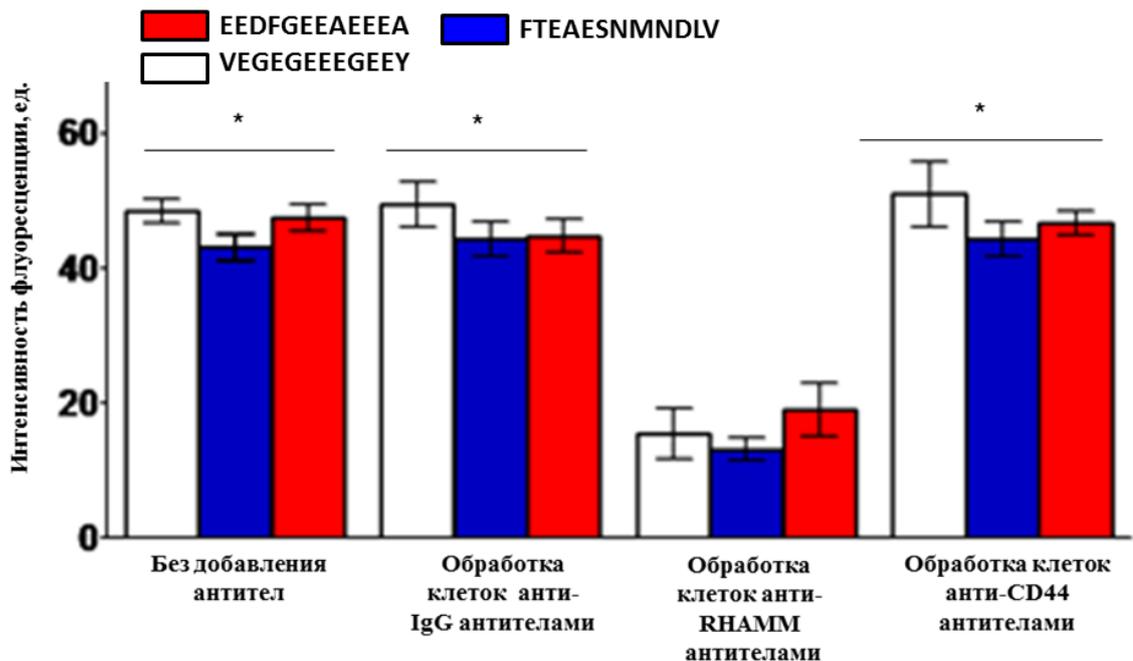
На следующем этапе работы мы исследовали также связывание FITC-пептидов (EEDFGEEAEAAA, VEGEGEEEGEEY и FTEAESNMNDLV) с клетками рака предстательной железы (PC3m-LN4) с помощью конфокальной микроскопии. На Рисунке 38 представлены конфокальные изображения, демонстрирующие связывание пептида FTEAESNMNDLV с клетками (PC3m-LN4).

Эксперимент проводили аналогично, как описано ранее для клеток рака молочной железы. Заметное снижение интенсивности флуоресценции наблюдалось, когда RHAMM блокировали на поверхности клеток анти-RHAMM антителами, что указывает на связывание пептида с RHAMM рецептором. Показано, что предварительная обработка клеток с анти-IgG или анти-CD44 антителами не влияла на уровень флуоресценции. На Рисунке 39 представлен количественный анализ связывания FITC-пептидов с клетками PC3m-LN4 с помощью программы ImageJ [19].

Таким образом, установлено, что FITC-пептид селективно связывался с RHAMM рецептором на поверхности клеток РПЖ.



**Рисунок 38** – Визуализация связывания FITC-пептида (FTEAESNMNDLV) с клетками рака предстательной железы с помощью конфокальной микроскопии. Для окрашивания ядер клеток был использован DAPI (синий цвет), а FITC-пептид окрашен зеленым цветом (FITC). Перед добавлением FITC-пептида клетки инкубировали с анти-IgG, анти-CD44 или анти-RHAMM антителами. Клетки, которые не обрабатывали антителами, или клетки, обработанные антителами IgG, служили в качестве положительного контроля.



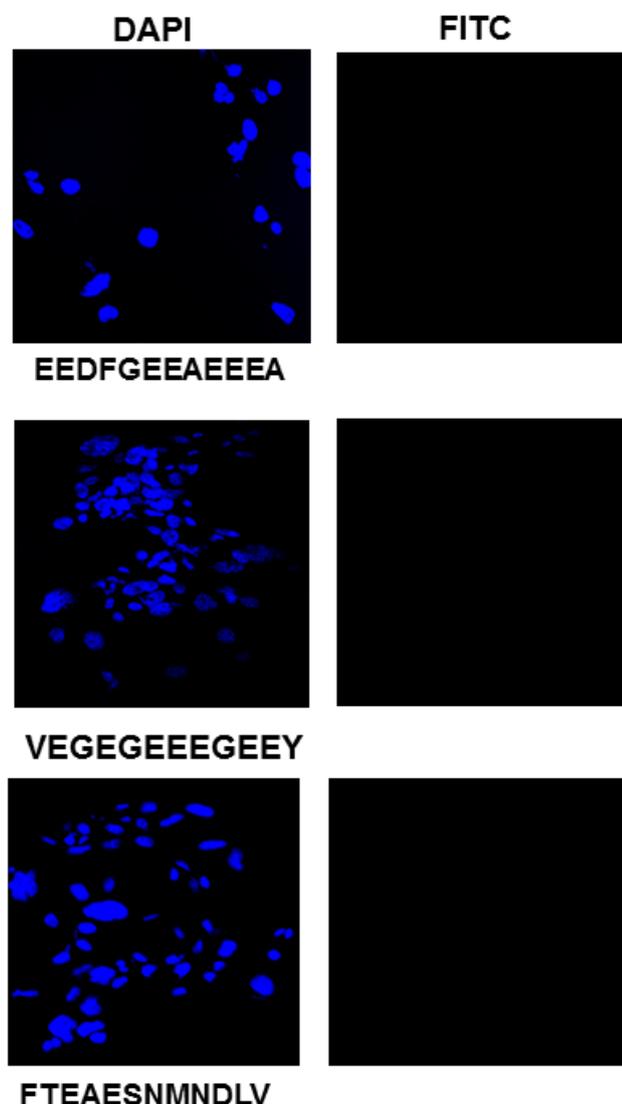
**Рисунок 39** – Количественная оценка связывания FITC-пептидов с клетками PC3m-LN4. Используя программное обеспечение ImageJ, были выбраны области интереса (ROI), общее число

проанализированных клеток составило 1048,  $n = 3$ . Средняя величина интенсивности флуоресценции для каждого ROI была получена с использованием 8-битных изображений и представлена в виде гистограммы. Статистически значимые различия были получены с использованием One-Way ANOVA и помечены \*  $p \leq 0,05$  по отношению к клеткам, обработанным анти-RHAMM антителами.

### 3.2.14. Исследование связывания RHAMM-таргет пептидов с фибробластами RHAMM<sup>(-/-)</sup> и фибробластами, трансфицированными с RHAMM<sup>(+/+)</sup>

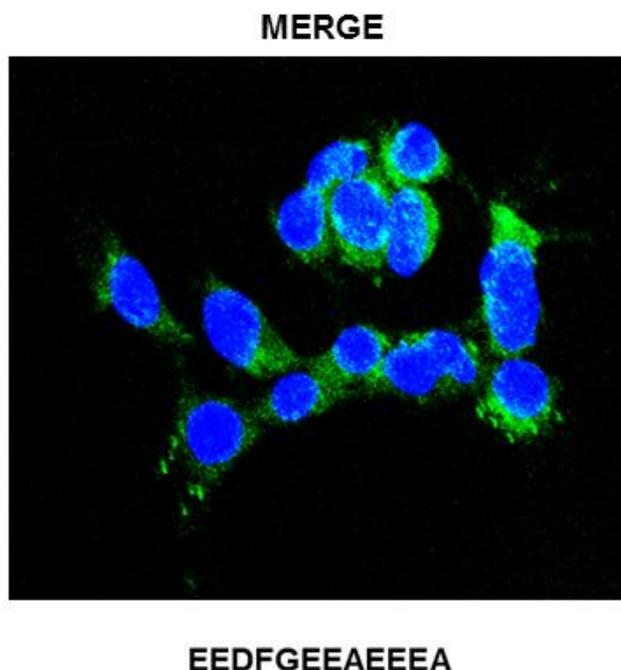
Чтобы проверить, является ли RHAMM необходимым для связывания пептидов с клетками, мы изучали взаимодействие FITC-пептидов с нокаут фибробластами RHAMM<sup>(-/-)</sup>, в которых отсутствует этот рецептор, а также с фибробластами, трансфицированными с RHAMM<sup>(+/+)</sup>.

Для этого RHAMM<sup>(-/-)</sup> фибробласты инкубировали с FITC-пептидами (EEDFGEEAEEEE, VEGEGEEEGEEY и FTEAESNMNDLV) и затем анализировали методом конфокальной микроскопии (Рисунок 40).



**Рисунок 40** – Визуализация FITC-пептидов в RHAMM<sup>(-/-)</sup> клетках.

Результаты показали, что в фибробластах RHAMM<sup>(-/-)</sup> не наблюдалось FITC-флуоресценции. Однако добавление FITC-пептидов к фибробластам, трансфицированным с RHAMM<sup>(+/+)</sup>, продемонстрировало появление интенсивной флуоресценции (Рисунок 41). Это указывает и подтверждает полученные нами ранее данные, что связывание FITC-пептидов происходит именно с RHAMM [1].



**Рисунок 41** – Визуализация FITC-пептида EEDFGEEAEEEE в RHAMM<sup>(+/+)</sup> клетках.

Таким образом, на этом этапе исследования мы идентифицировали пептиды, представляющие собой укороченные остатки  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц тубулина, которые действуют как миметики ГК. Мы впервые показали, что пептиды специфично связываются как с рекомбинантным RHAMM-СТ, так и с RHAMM рецептором на поверхности опухолевых клеток. Мы также показали, что эти пептиды являются стабильными в сыворотке крови [163]. Подобная специфичность взаимодействия пептидов с RHAMM позволяет предположить, что эти пептиды могут быть использованы для визуализации опухолевых клеток с целью ранней молекулярной диагностики онкологических заболеваний [14].

### **3.3. Исследование влияния RHAMM-таргет пептидов на выживаемость опухолевых клеток**

В предыдущих экспериментах мы идентифицировали, синтезировали и охарактеризовали пептиды, специфично взаимодействующие с RHAMM рецептором [163]. На основании полученных данных, мы ввели новый термин, назвали эти пептиды RHAMM-таргет пептидами и использовали это название в последующих экспериментах [2, 14, 20]. На следующем этапе работы мы исследовали терапевтический потенциал RHAMM-таргет пептидов, а именно, влияние

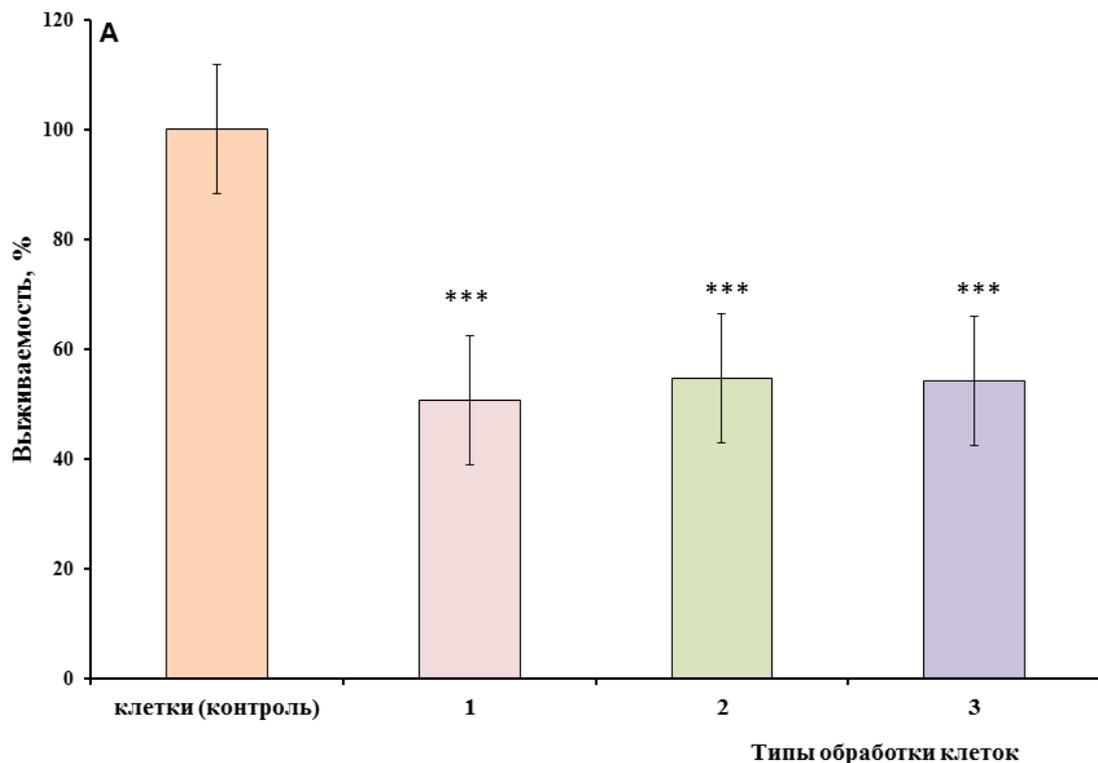
пептидов на выживаемость, пролиферацию, апоптоз/некроз и инвазивность опухолевых клеток РМЖ и РПЖ [2, 14, 20].

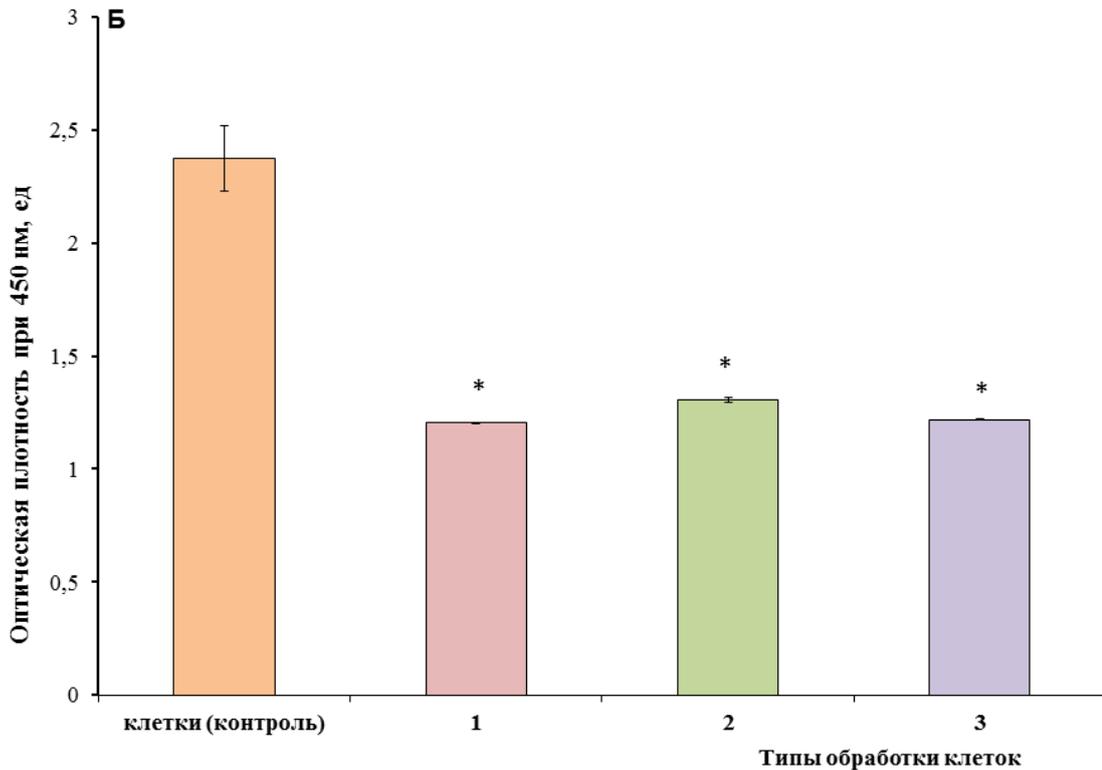
### 3.3.1. Влияние RHAMM-таргет пептидов на выживаемость и пролиферацию клеток рака молочной железы

Исследовали влияние пептидов (EEDFGEEAEAAA, VEGEGEEEGEEY и FTEAESNMNDLV) на выживаемость клеток РМЖ [14]. Для этого к клеткам MDA-MB-231 добавляли пептиды при концентрации 10 мкг/мл ( $2 \times 10^{-7}$  М) и инкубировали в течение 48 часов [2, 14, 15]. Выживаемость клеток анализировали с помощью резазурина (AlamarBlue реагент), как описано в «Методах исследования» [2]. Результаты показали, что инкубация с пептидами в течение 48 час подавляла выживаемость клеток MDA-MB-231 на 50% (Рисунок 42, А) [2, 14].

Влияние RHAMM-таргет пептидов на пролиферацию клеток анализировали, как описано в «Методах исследования» [2]. Установлено, что пептиды также подавляли пролиферацию клеток MDA-MB-231 в 2 раза (Рисунок 42, Б) [20].

Следует подчеркнуть, что выживаемость и пролиферация клеток рака молочной железы значительно подавлялись низкими концентрациями пептидов, что является реальным преимуществом для использования этих пептидов в качестве потенциальных противоопухолевых препаратов [14, 20].



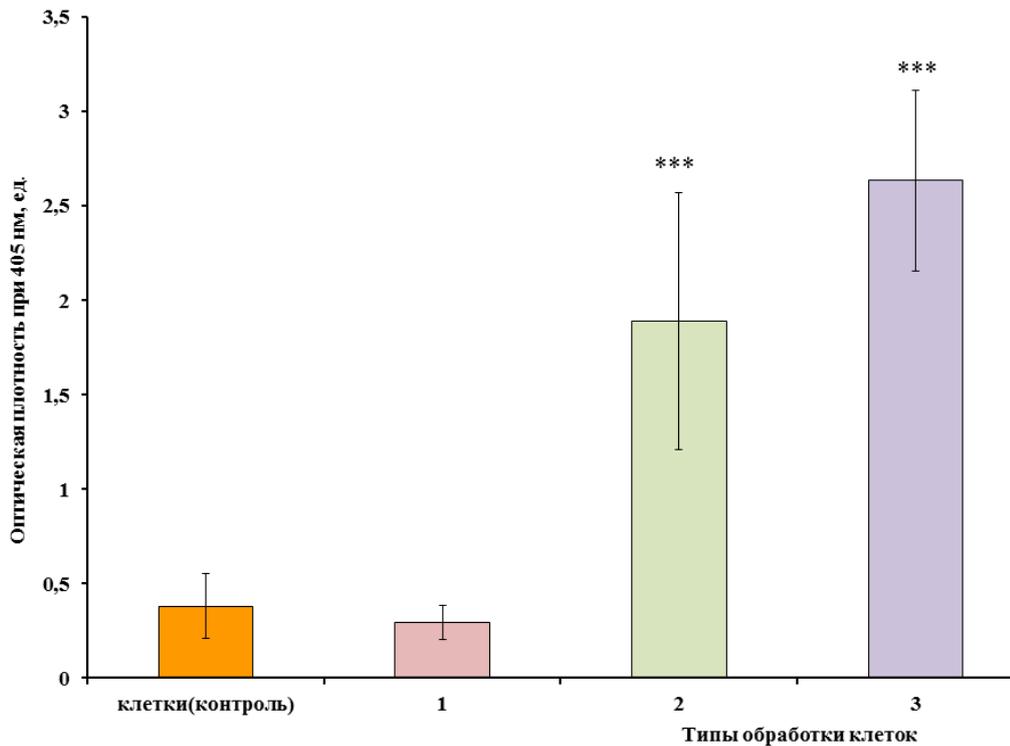


**Рисунок 42** – Эффект RHAMM-таргет пептидов: EEDFGEEAEEEA (1), VEGEGEEEGEEY(2) и FTEAESNMNDLV(3) на выживаемость (А) и пролиферацию (Б) MDA-MB-231 клеток. Различия были статистически значимыми (\*\*\*)  $p \leq 0,0005$  и \*  $p \leq 0,05$ ) по отношению к контрольным клеткам, необработанным пептидами.

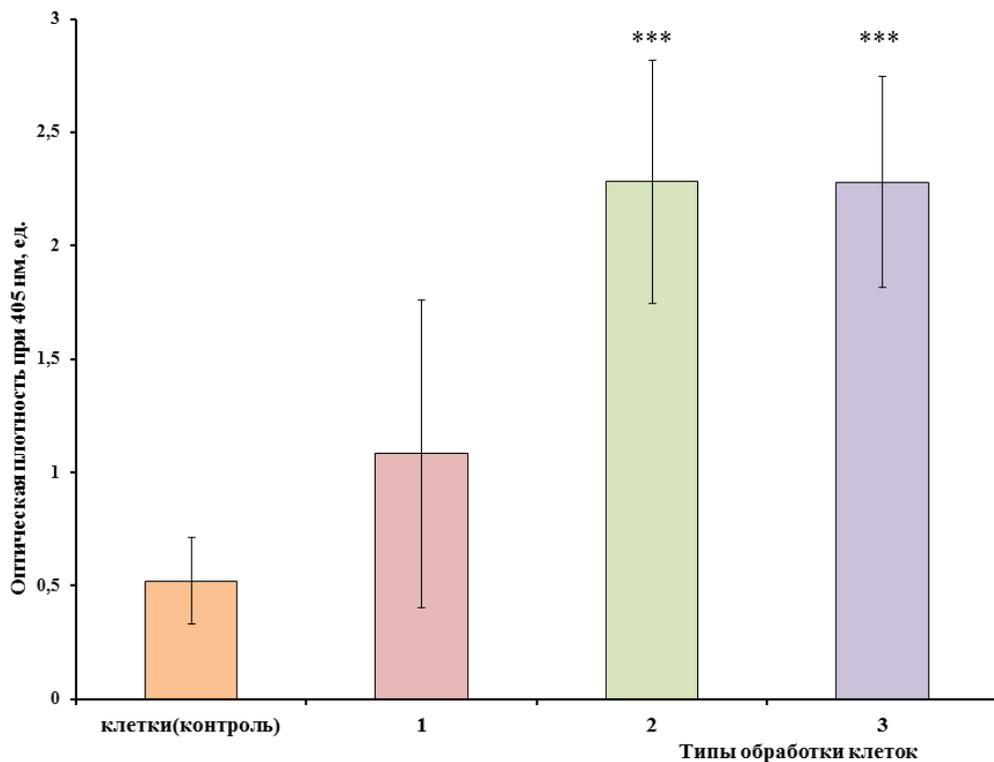
### 3.3.2. Исследование влияния RHAMM-таргет пептидов на апоптоз и некроз опухолевых клеток молочной железы

Так как выживаемость клеток значительно подавлялась RHAMM-таргет пептидами, было важно классифицировать, какой тип гибели наблюдался в клетках MDA-MB-231 [14]. Анализ типа гибели клеток проводили методом ELISA, как описано в «Методах исследования» [14]. Результаты показали, что при концентрации 10 мкг/мл ( $2 \times 10^{-7}$  М) RHAMM-таргет пептиды (EEDFGEEAEEEA, VEGEGEEEGEEY и FTEAESNMNDLV) индуцировали апоптоз в MDA-MB-231 клетках, примерно, в 4-5 раз (Рисунок 43) [14].

Эти результаты показывали, что RHAMM-таргет пептиды вовлечены в апоптозные пути в MDA-MB-231 клетках. Затем мы исследовали влияние RHAMM-таргет пептидов на некроз MDA-MB-231 клеток. Было установлено, что два пептида (VEGEGEEEGEEY и FTEAESNMNDLV) значительно увеличивали некротическую гибель MDA-MB-231 клеток (в 4 раза, Рисунок 44) [14].

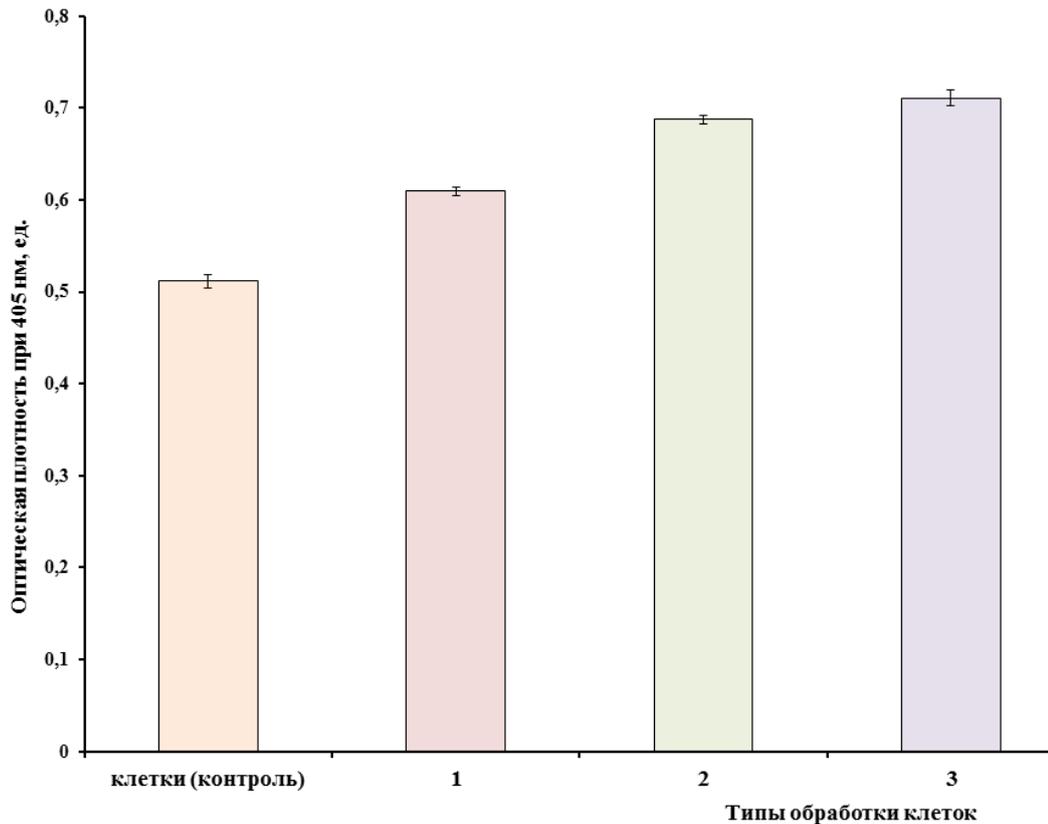


**Рисунок 43** – Индукция апоптоза в MDA-MB-231 клетках посредством RHAMM-таргет пептидов: EEDFGEEAEEEE (1), VEGEGEEEGEEY(2), FTEAESNMNDLV (3). \*\*\* –  $p \leq 0,0005$  по отношению к контрольным клеткам без инкубации с пептидами.



**Рисунок 44** – Индукция некроза в MDA-MB-231 клетках посредством RHAMM-таргет пептидов: EEDFGEEAEEEE (1), VEGEGEEEGEEY(2), FTEAESNMNDLV (3). \*\*\* –  $p \leq 0,0005$  по отношению к контрольным клеткам без обработки пептидами.

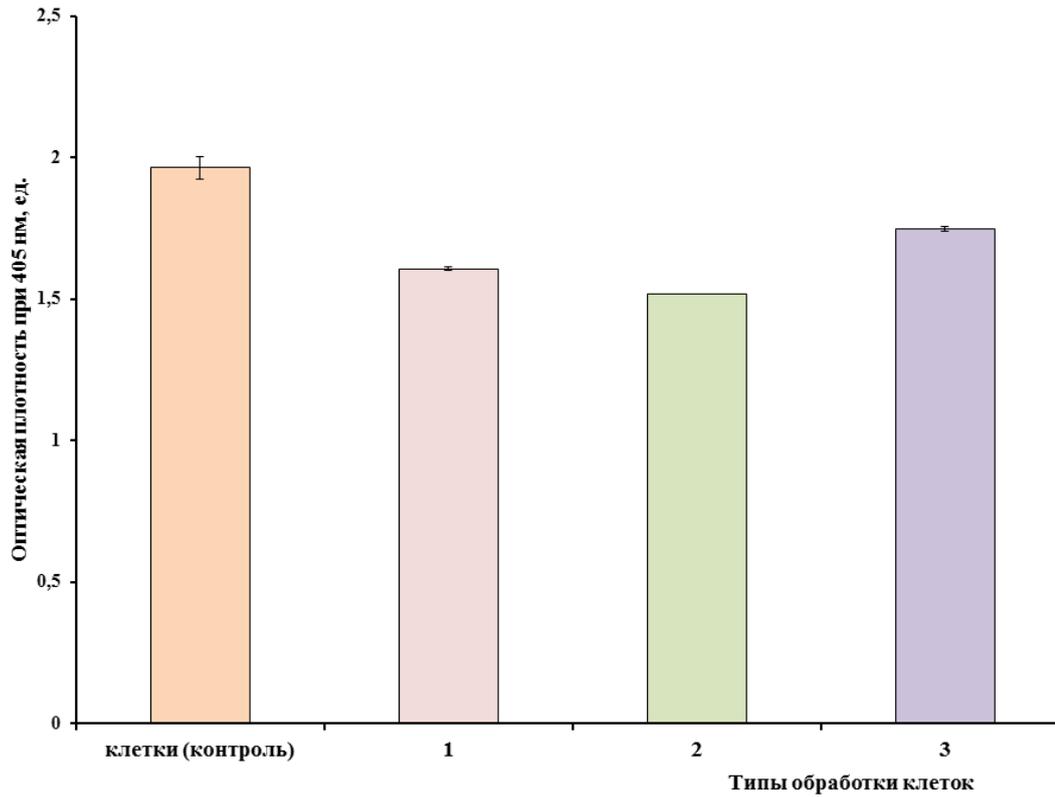
Для того чтобы подтвердить специфичность действия пептидов на опухолевые клетки, мы изучали влияние RНАММ-таргет пептидов на апоптоз и некроз в нормальных клетках (MEF фибробласты) [14]. Результаты показали, что RНАММ-таргет пептиды не оказывали значительного эффекта на апоптоз и некроз нормальных клеток (Рисунки 45, 46) [14]. Наблюдаемые небольшие различия не были статистически значимыми.



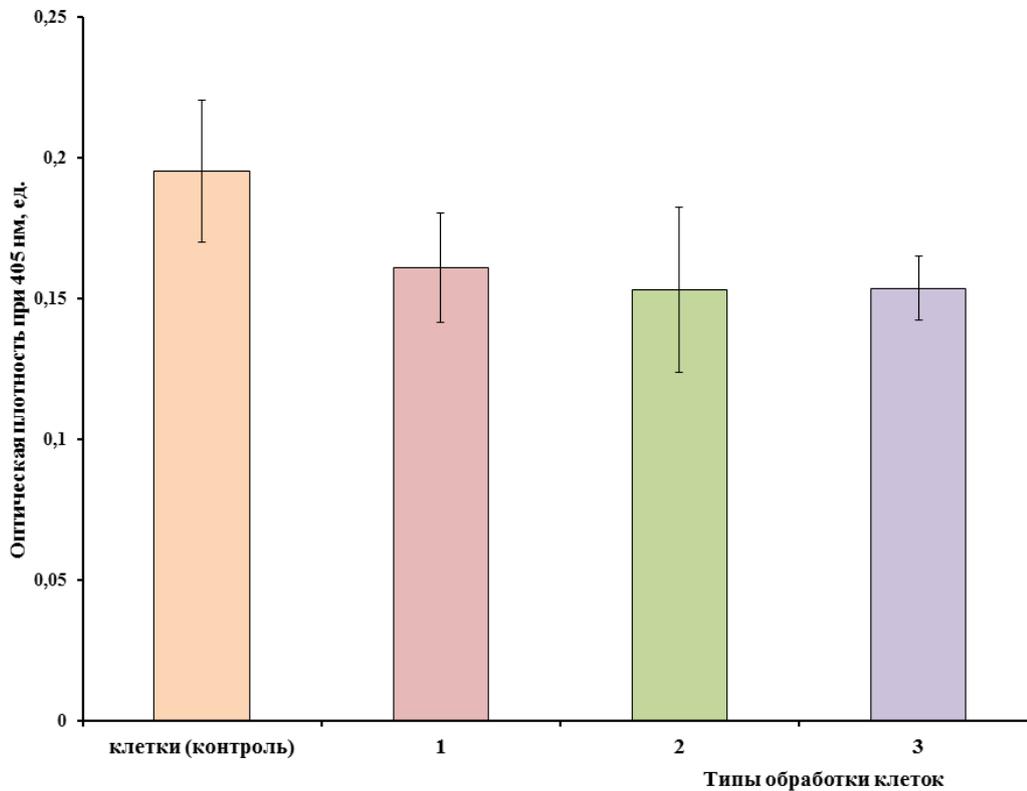
**Рисунок 45** – Влияние RНАММ-таргет пептидов: EEDFGEEAEEEE (1), VEGEGEEEGEEY(2), FTEAESNMNDLV (3) на апоптоз MEF фибробластов. В качестве контроля использовали клетки без обработки пептидами.

Мы также исследовали влияние пептидов на нокаут фибробласты RНАММ<sup>(-/-)</sup>, в которых отсутствует RНАММ. Было установлено, что все три пептида практически не оказывали влияния на апоптоз и некроз RНАММ<sup>(-/-)</sup> клеток (Рисунки 47, 48) [2]. Это согласуется с нашими данными, что пептиды действуют только на клетки, сверхэкспрессирующие RНАММ [2, 14].

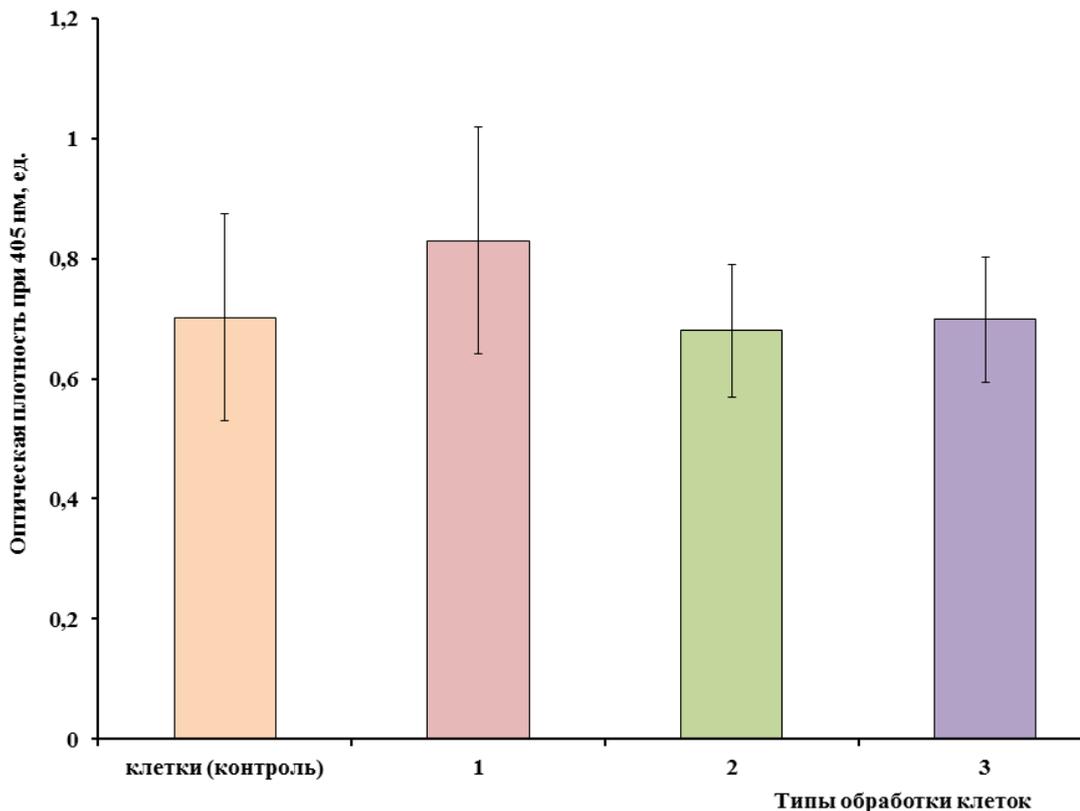
Эти результаты подтверждают тот факт, что эффект RНАММ-таргет пептидов на апоптоз и некроз является специфичным для опухолевых клеток и RНАММ опосредованным. В целом, полученные данные показали, что низкие концентрации RНАММ-таргет пептидов индуцировали гибель клеток РМЖ [14].



**Рисунок 46** – Влияние RHAMM-таргет пептидов: EEDFGEEAEEEE (1), VEGEGEEEGEEY(2), FTEAESNMNDLV (3) на некроз MEF фибробластов. Контроль представляет клетки без инкубации с пептидами.



**Рисунок 47** – Влияние RHAMM-таргет пептидов: EEDFGEEAEEEE (1), VEGEGEEEGEEY(2), FTEAESNMNDLV (3) на апоптоз фибробластов RHAMM<sup>(-/-)</sup>. Контрольные клетки не инкубировали с пептидами.



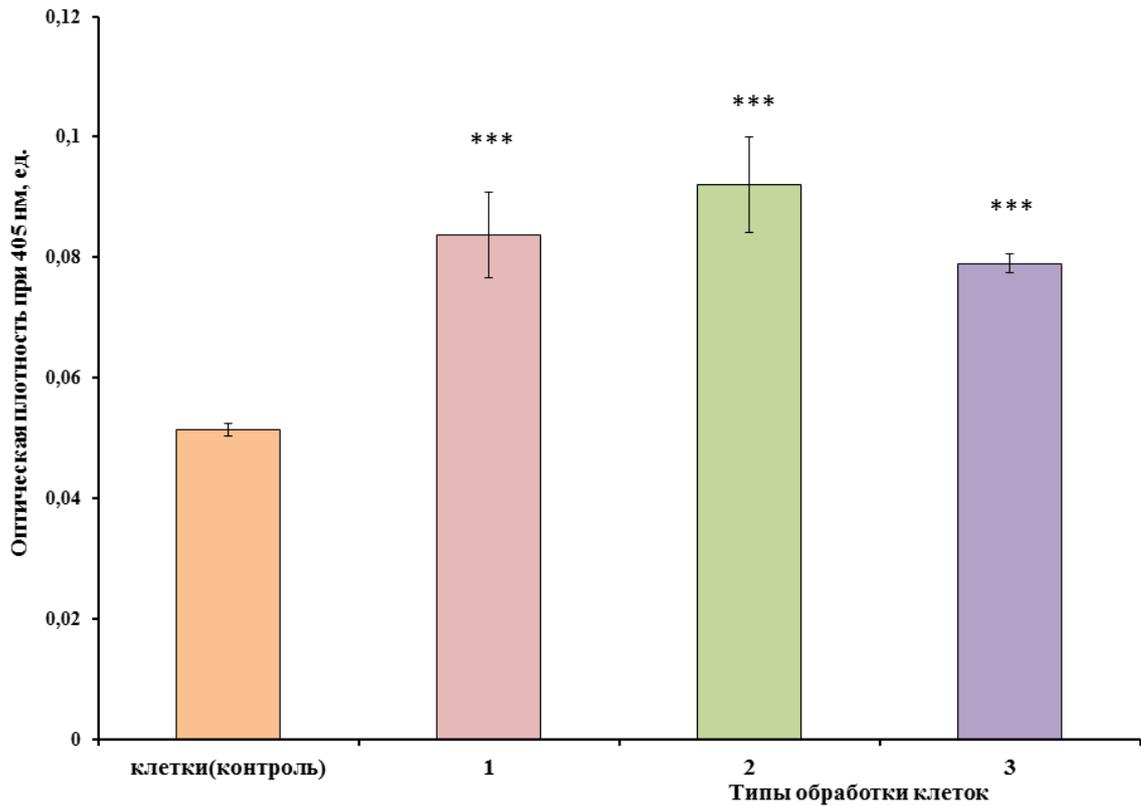
**Рисунок 48** – Влияние RHAMM-таргет пептидов: EEDFGEEAEAAA (1), VEGEGEEEGEEY(2), FTEAESNMNDLV (3) на некроз фибробластов RHAMM<sup>(-/-)</sup>. Контроль представляет клетки без добавления пептидов.

### 3.3.3. Влияние RHAMM-таргет пептидов на активность каспаз-3/7

Поскольку результаты показали индукцию апоптоза в клетках под действием пептидов, мы также исследовали влияние RHAMM-таргет пептидов на активность каспаз-3/7, отвечающих за митохондриальный путь апоптоза) [2, 14, 16].

Пептиды (EEDFGEEAEAAA, VEGEGEEEGEEY и FTEAESNMNDLV, 10 мкг/мл) добавляли к клеткам MDA-MB-231 и инкубировали в течение 24 час. Затем активность каспаз-3/7 измеряли колориметрическим методом (расщепление меченого субстрата каспаз DEVD – p-нитроанилида) [2, 16]. Результаты показали, что активность каспаз-3/7 увеличилась на 30% в MDA-MB-231 клетках по сравнению с контрольными клетками, необработанными пептидами (Рисунок 49) [2, 14, 16]. Эти данные подтверждают участие каспаз-3/7 в индукции апоптоза в опухолевых клетках MDA-MB-231, так как все три пептида значительно активировали активность этих ферментов [14, 16].

Таким образом, наши результаты показывают, что RHAMM-таргет пептиды ингибируют жизнеспособность, индуцируют апоптоз и некроз клеток рака молочной железы. Эти данные позволяют предположить, что RHAMM-таргет пептиды могут быть использованы в качестве препаратов для адресной терапии рака [14, 16], поскольку они являются специфичными для опухолевых клеток.



**Рисунок 49** – Эффект RHAMM-таргет пептидов на активность каспаз-3/7 в MDA-MB-231 клетках: EEDFGEEAEEEE (1), VEGEGEEEGEEY(2), FTEAESNMNDLV (3). \*\*\* –  $p \leq 0,0005$  по отношению к контрольным клеткам без инкубации с пептидами.

### 3.4. Влияние RHAMM-таргет пептидов на инвазивность клеток рака молочной железы

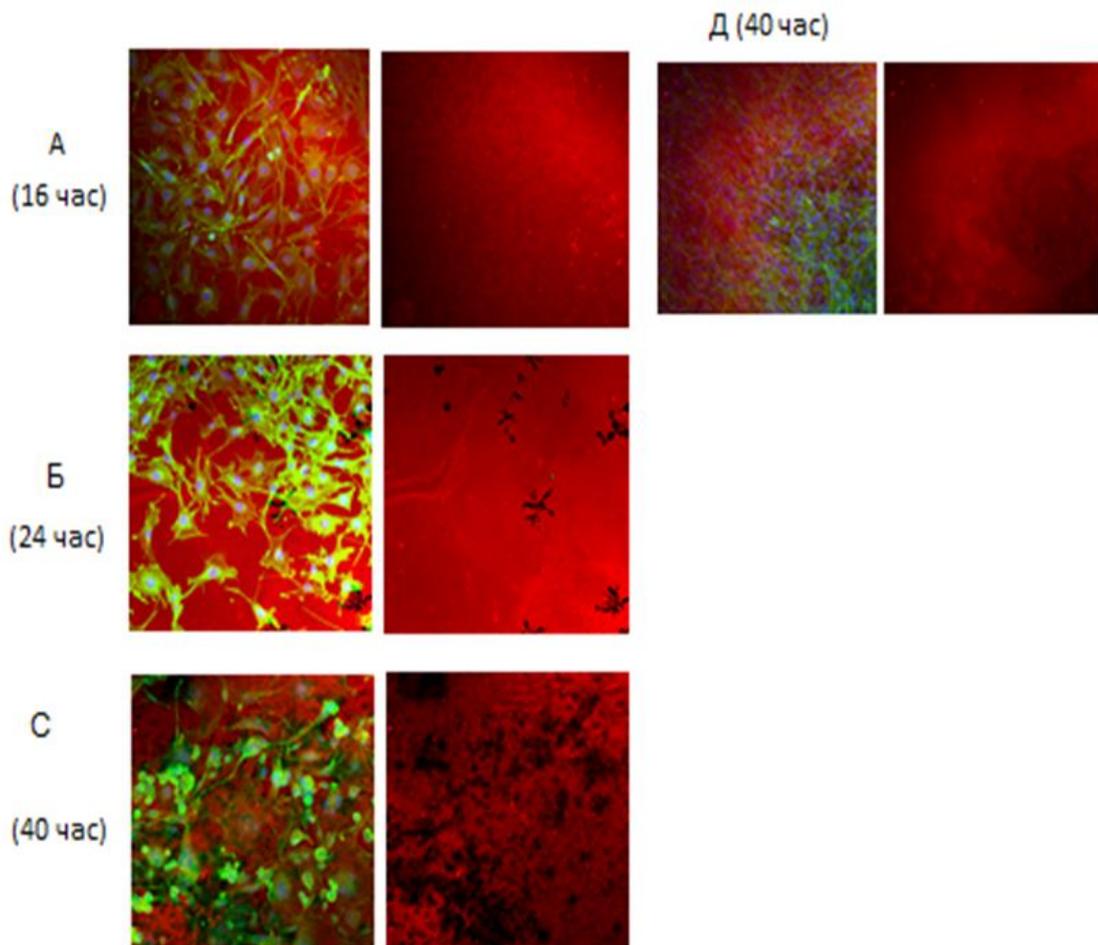
Процессы инвазивности опухолевых клеток и образование метастазов являются основными проблемами при лечении онкологических заболеваний. Поэтому на следующем этапе мы исследовали антиметастатический потенциал пептидов на клеточном уровне [16].

#### 3.4.1. Анализ инвазивности опухолевых клеток MDA-MB-231 во времени

Чтобы оценить развитие инвазивности клеток во времени, вначале мы анализировали деградацию желатина клетками через 16, 24 и 40 часов (Рисунок 50, А, Б, С). На конфокальных изображениях видно, что инвазивность клеток прогрессировала во времени. Вначале она практически отсутствовала (через 16 час), затем мы наблюдали незначительную деградацию желатина (через 24 часа), а через 40 часов инвазивность клеток достигла максимальной величины [16].

Следует отметить, что для инвазивных клеток MDA-MB-231 наблюдается протеолиз желатина, относящийся к образованию инвадоподий в виде областей, в которых отсутствует флуоресценция желатина, на изображениях эта область черного цвета (Рисунок 50, Б, С). Инвазивные MDA-MB-231 клетки имеют большое количество инвадоподий, высокую концентрацию актина на концах клетки (Рисунок 50, С) [16, 18]. Для сравнения инвазивности опухолевых и

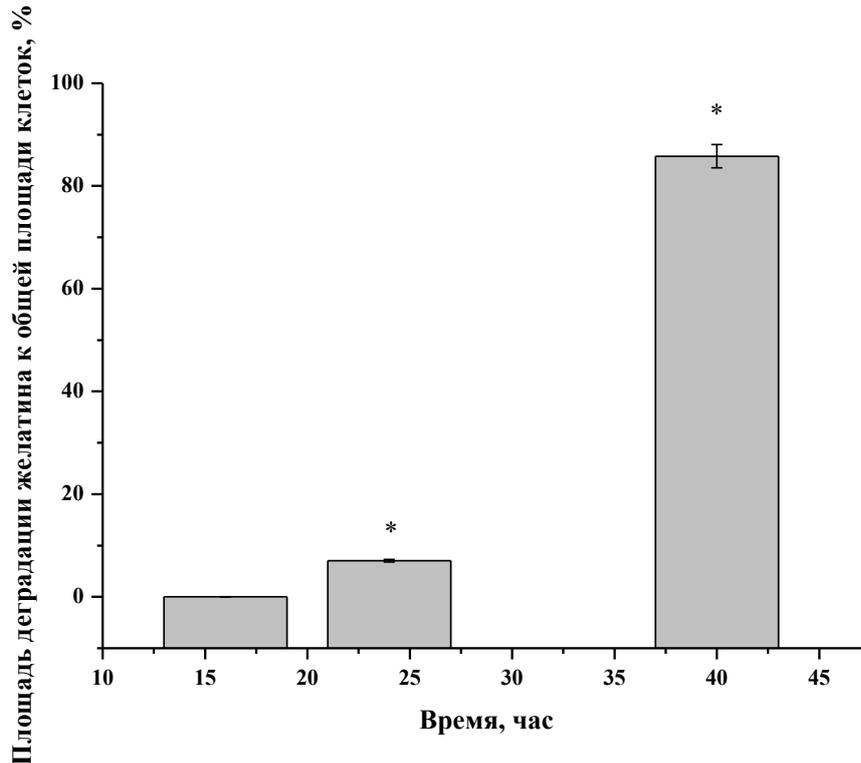
нормальных клеток, мы также анализировали инвазивность MEF фибробластов через 40 час (Рисунок 50, Д) [16]. Как видно, фибробласты не деградировали желатин, что указывает на отсутствие инвазивности в нормальных клетках. Количественный анализ площади деградации с помощью ImageJ программы показал, что клетки MDA-MB-231 начинали деградировать желатин через 24 часа, и площадь деградации возрастала от ~8% до ~90% в интервале между 24 и 40 часами (Рисунок 51) [16].



**Рисунок 50** – Анализ инвазивности MDA-MB-231 клеток во времени: **А** – через 16 часов, **Б** – через 24 часа, **С** – через 40 часов, **Д** – инвазивность MEF фибробластов (контроль) через 40 часов. Увеличение  $\times 20$ .

Поскольку наиболее высокий уровень деградации желатина наблюдался через 40 час, в следующих экспериментах по влиянию пептидов на инвазивность клеток мы использовали это время выращивания клеток на желатиновых подложках [16].

Таким образом, установлено, что инвазивность клеток MDA-MB-231 возрастала во времени, и уровень деградации желатина достигал ~90% через 40 часов, тогда как нераковые клетки (фибробласты) не деградировали желатин совсем [16, 18].

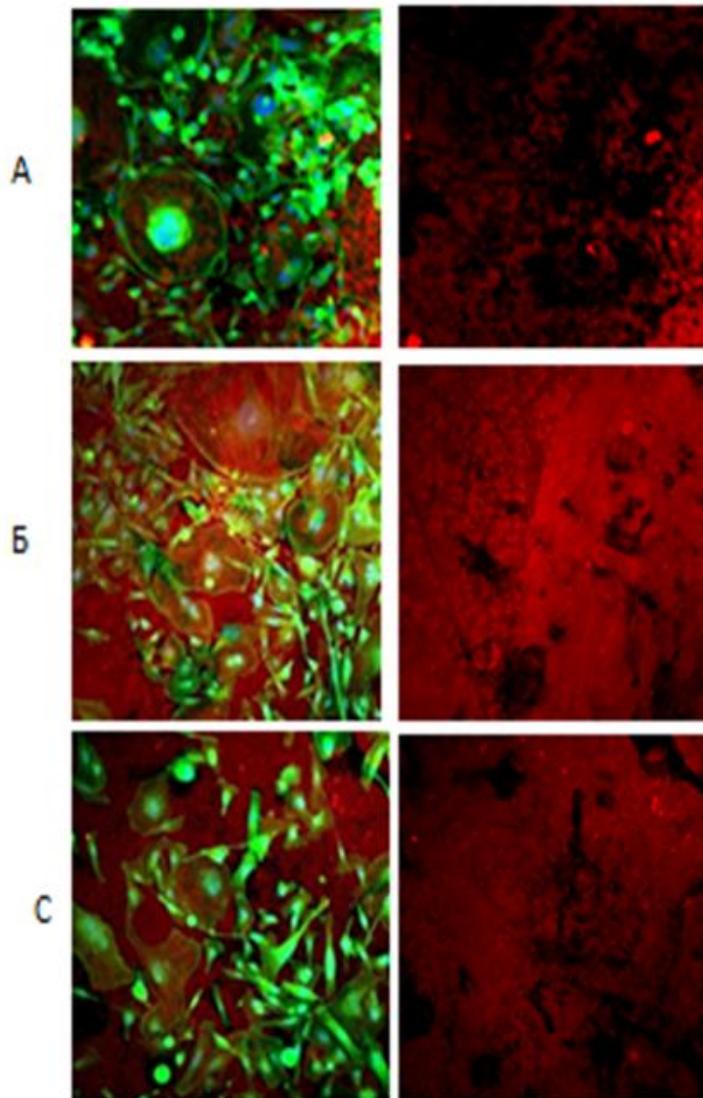


**Рисунок 51** – Количественный анализ деградации желатина MDA-MB-231 клетками во времени с помощью ImageJ software. \* –  $p \leq 0,05$  по отношению к деградации желатина клетками через 16 часов.

#### ***3.4.2. Эффект RHAMM-таргет пептидов на инвазивность клеток рака молочной железы***

Чтобы анализировать, могут ли RHAMM-таргет пептиды ингибировать инвазивность клеток рака молочной железы, MDA-MB-231 клетки высевали на Су3-флуоресцеин-желатиновые подложки, затем добавляли пептиды или только ростовую среду (DMEM, контроль) и выращивали клетки в течение 40 часов [16]. После фиксации и окраски клеток согласно протоколу, описанному в «Методах исследования», снимали изображения на конфокальном микроскопе и анализировали площадь деградации желатина клетками. Анализ изображений показал, что клетки MDA-MB-231, необработанные пептидами, демонстрировали высокий уровень деградации желатина (область черного цвета) (Рисунок 52, А).

В то же время предварительная обработка клеток RHAMM-таргет пептидами (EEDFGEEAEEEA и VEGEGEEEGEEY) [16] приводила к уменьшению площади деградации желатина, визуально область черного цвета резко сокращалась, что указывало на ингибирование инвазивности раковых клеток (Рисунок 52, Б, С).

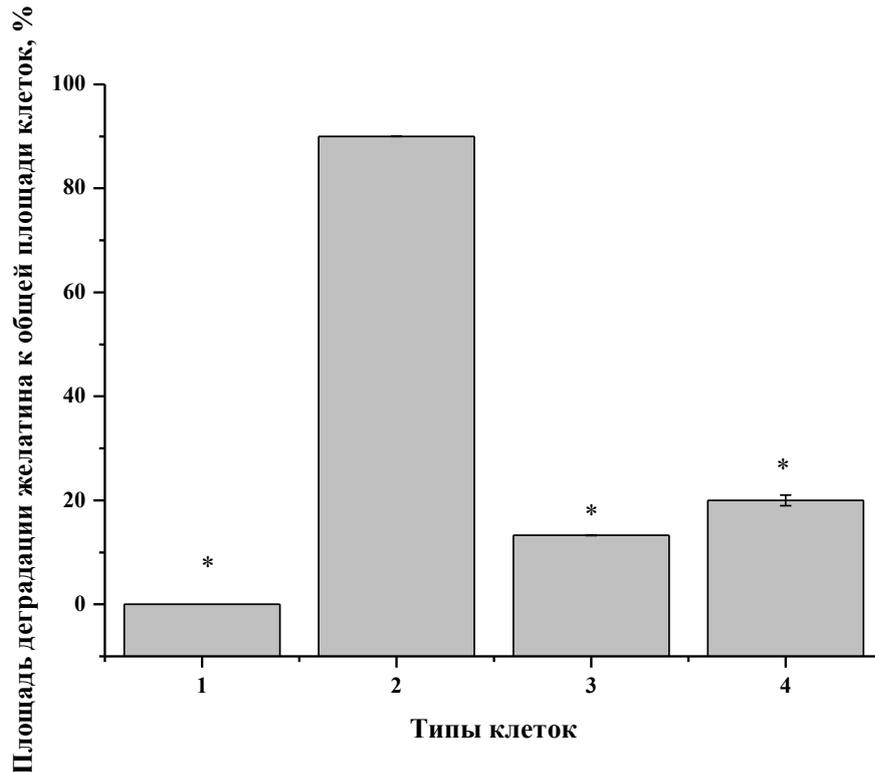


**Рисунок 52** – Эффект RHAMM-таргет пептидов на инвазивность клеток линии MDA-MB-231: **А** – клетки, необработанные пептидами (контроль), **Б** – клетки, обработанные пептидом EEDFGEEAEEEE, **С** – клетки, обработанные пептидом VEGEGEEEGEEY. Увеличение  $\times 20$ .

Количественный анализ площади деградации желатина с помощью ImageJ software показал, что клетки, необработанные пептидами, деградировали желатин на  $\sim 90\%$ , а клетки, обработанные пептидом EEDFGEEAEEEE, деградировали только 13% площади желатина по отношению к общей площади клеток, что свидетельствует о том, что инвазивность клеток РМЖ уменьшилась на 77% (в сравнении с контролем). Клетки, предварительно инкубированные с пептидом VEGEGEEEGEEY, деградировали 20% площади желатина и демонстрировали ингибирование инвазивности на 70% (Рисунок 53) [16].

Эти результаты показали, что RHAMM-таргет пептиды ингибируют образование инвадоподий и, соответственно, инвазивность опухолевых клеток РМЖ.

Таким образом, это свидетельствует о том, что RHAMM-таргет пептиды являются потенциальными препаратами для блокирования образования метастазов.

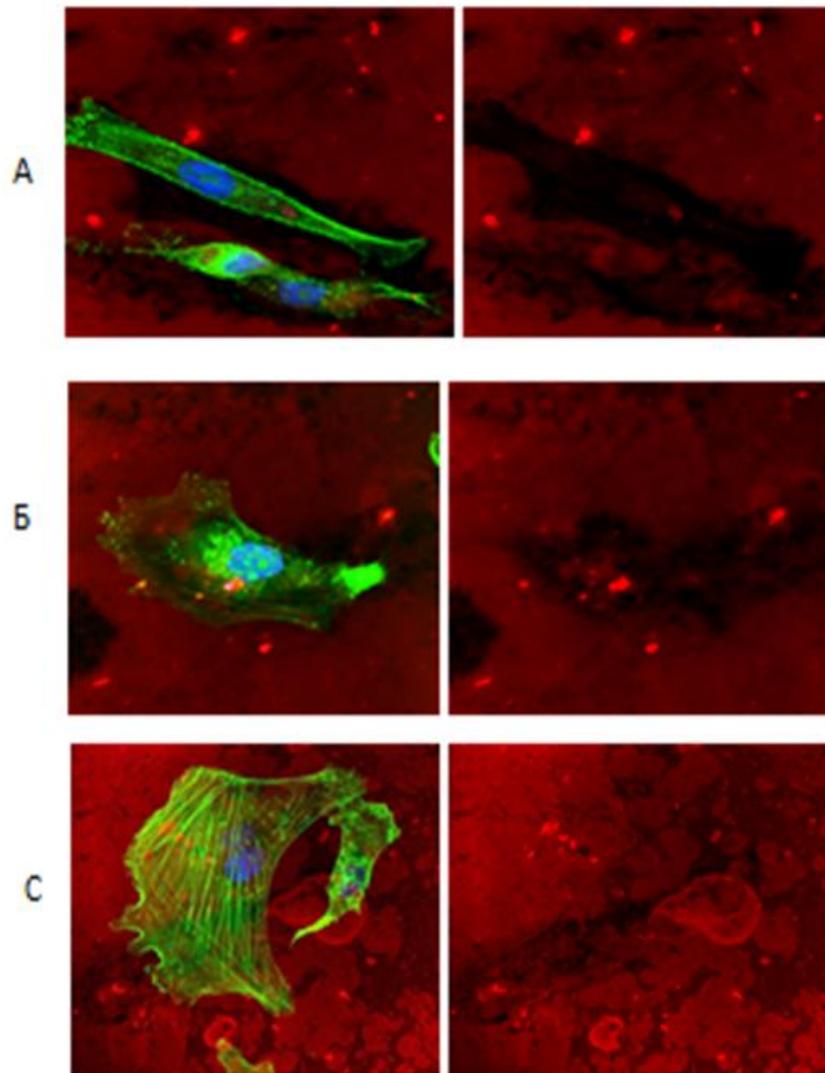


**Рисунок 53** – Количественный анализ деградации желатина различными типами клеток, с помощью ImageJ программы: 1 – MEF фибробласты, 2 – клетки MDA-MB-231, 3 – клетки MDA-MB-231 + пептид EEDFGEEAEEEA; 4 – клетки MDA-MB-231 + пептид VEGEGEEEGEEY. Различия являются статистически значимыми при \* –  $p \leq 0,05$  по отношению к контрольным клеткам без обработки пептидами.

### 3.4.3. Анализ гетерогенности популяции MDA-MB-231 клеток в процессе развития инвазивности

Известно, что опухоли являются гетерогенными и содержат несколько субпопуляций, что, вероятно, обеспечивает выживание и дает преимущества для роста первичных опухолей и образования метастазов [16, 334, 367]. Гетерогенность опухолевых клеток объясняет прогрессирование опухоли, процессы рецидива и предполагает новые подходы для терапии [16, 494, 563]. Несмотря на достижения в оценке генотипической и фенотипической гетерогенности опухолей, анализ субпопуляций опухолевых клеток в процессе инвазивности методом флуоресцентной микроскопии в литературе отсутствует [16]. Поэтому мы анализировали популяцию опухолевых клеток (MDA-MB-231) в процессе развития инвазивности с помощью конфокальной микроскопии [16]. При визуальном анализе изображений было установлено, что наблюдаются заметные морфологические (и, следовательно, биохимические) различия между клетками внутри популяции клеточной линии MDA-MB-231. Как было описано ранее, анализ инвазивности клеток во времени показал, что MDA-MB-231 клетки не деградировали желатин в течение 16 часов, и незначительная деградация наблюдалась только через 24 часа [16]. В течение этого времени (до 24 часов), все клетки были однородными, имели одинаковый размер и форму, длинные инвадоподии, связи между филаментами (Рисунок 50, А, Б) [16]. Интенсивная инвазив-

ность клеток в желатиновый матрикс и его деградация наблюдалась только через 40 часов (Рисунок 50, С) [16]. На изображениях видно, что в этот период отмечается увеличенная и четко выраженная концентрация актина на концах инвадоподий клеток, появляются актиновые филаменты толстого диаметра, площадь деградации желатина возрастает и полностью соответствует форме и размеру клеток, что свидетельствует об образовании большого количества инвадоподий (Рисунок 54, А, Б, С, увеличение  $\times 60$ ) [16].



**Рисунок 54** – Клетки MDA-MB-231, необработанные пептидами, при увеличении  $\times 60$ . **А** – клетки с высокой концентрацией актина в цитоплазме и по краям клетки, **Б** – концентрированная локализация актина на концах инвадоподий, **С** – гигантская клетка (senescence cell) с упорядоченной организацией актиновых филаментов, рядом – мелкая инвазивная клетка с длинной инвадоподией и концентрированной локализацией актина.

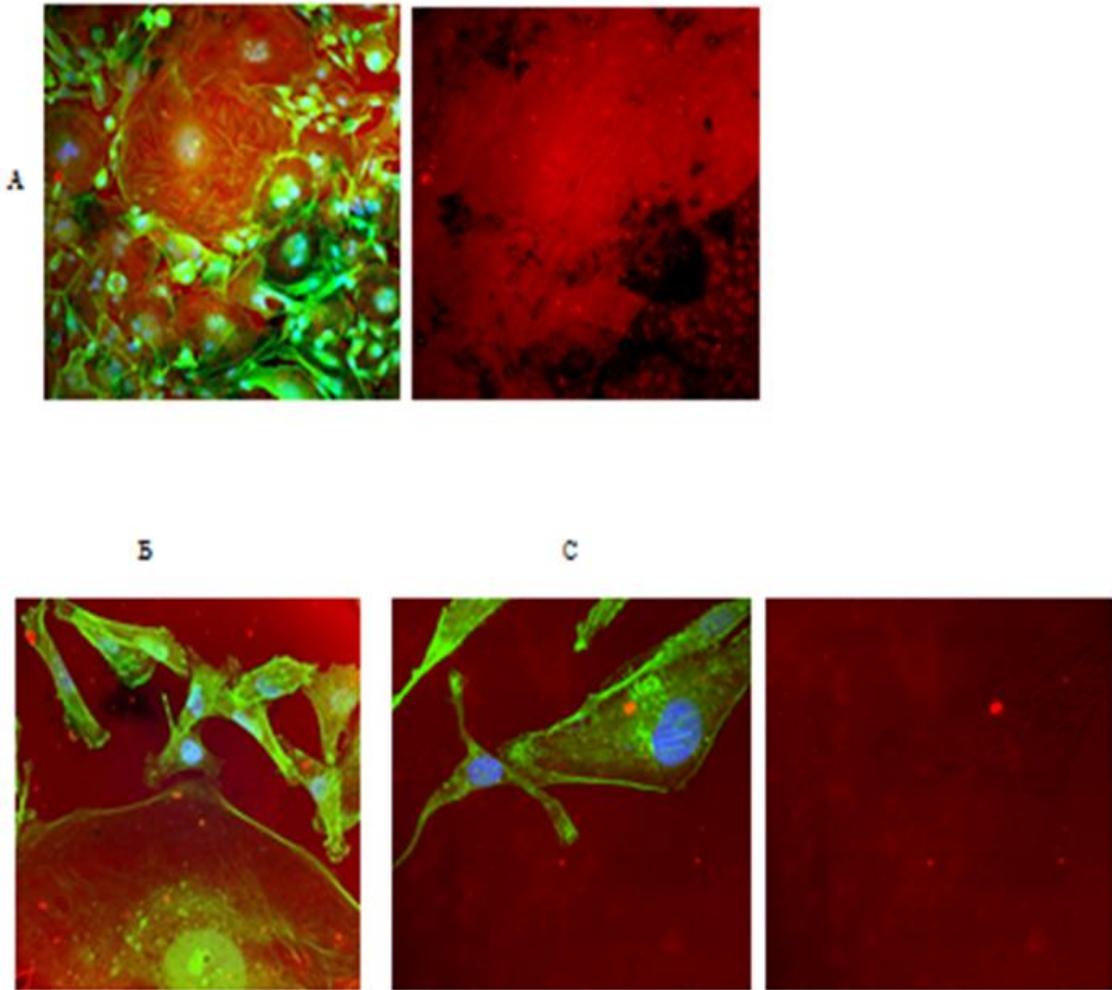
Кроме того, наблюдается появление гигантских (senescence cells, клетки старения) клеток в популяции, что коррелирует с началом интенсивной инвазивности (Рисунок 52, А; Рисунок 54, С; Рисунок 55, А, Б) [16, 18]. Эти гигантские клетки имели другую морфологию, а именно, большой размер (они были приблизительно в 10 раз больше по сравнению с обычными клетка-

ми) и у них отсутствовали длинные инвадоподии. В этих клетках наблюдалась упорядоченная структурная организация актина, актиновые филаменты имели форму прямых и толстых пучков. Кроме того, эти гигантские (senescence cells) клетки имели либо крупное ядро, либо наблюдалась многоядерность, количество ядер варьировало от 2 до 6 в клетке (ядра были сгруппированы вместе) [16]. Из литературы известно, что наличие би- и много-ядерных клеток объясняется нарушением экспрессии мембранного белка супервиллина, который взаимодействует с RНАММ рецептором, координирует актин и двигательные функции микротрубочек в течение клеточного цикла и таким образом влияет на подвижность клеток, ERK-сигналинг, цитокинез и матриксную инвазивность [16, 494]. Поскольку появление подобных гигантских клеток старения коррелировало с началом интенсивной инвазивности, можно предположить, что процесс инвазивности сопровождается нарушением в цитокинезе клеток и часть клеток претерпевает морфологические изменения. На конфокальных изображениях видно, что гигантские клетки находятся в окружении мелких клеток и связаны с ними (Рисунок 52, А; Рисунок 54, С; Рисунок 55, А, Б) [16, 18]. Следует отметить, что именно клетки мелкого размера являются инвазивными и наиболее интенсивно деградируют желатиновый матрикс. Эти мелкие клетки имеют типичную злокачественную, поляризованную клеточную морфологию, эллиптическую форму, длинные взаимосвязанные инвадоподии, интенсивную концентрацию актина на концах инвадоподий, позволяющую им проникать внутрь матрикса.

#### ***3.4.4. Морфологические изменения актина в клетках РМЖ при обработке RНАММ-таргет пептидами***

На следующем этапе мы исследовали влияние пептидов на морфологию клеток линии MDA-MB-231 [16]. Нами показано, что обработка клеток RНАММ-таргет пептидами приводила к значительным изменениям в структурной организации актина в клетках [16]. На конфокальных изображениях видно, что после инкубации клеток с пептидом EEDFGEEAEEEE также наблюдалось два типа клеток, а именно, гигантские (senescence cells) и мелкие клетки (Рисунок 52, Б, С; Рисунок 55, А, Б, С) [16, 18].

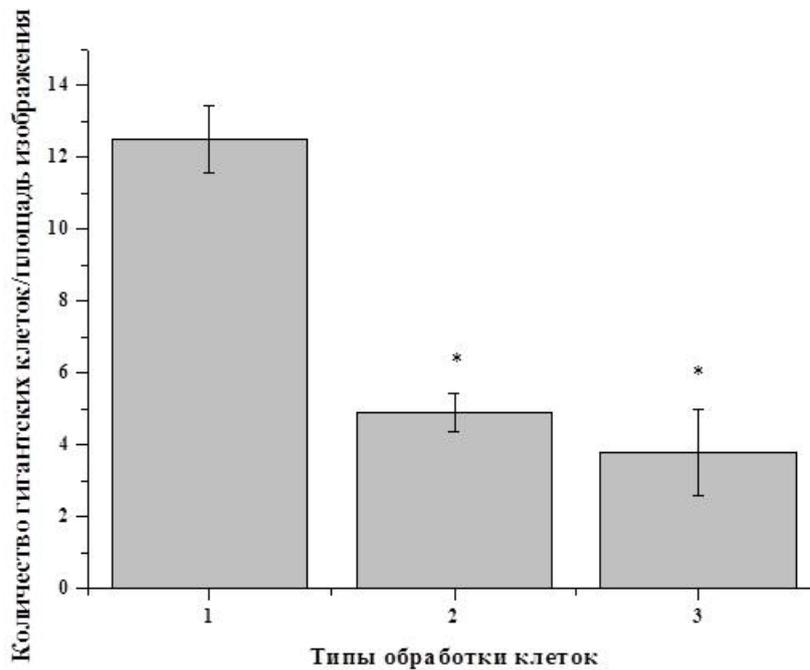
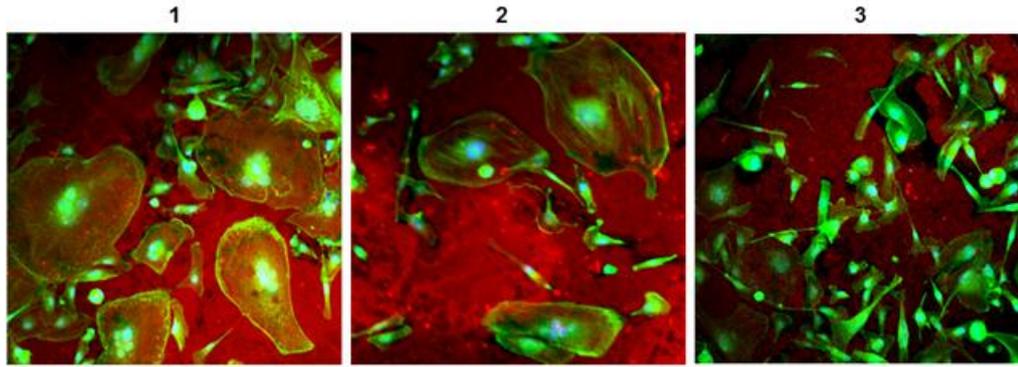
Однако в данном случае в гигантских клетках (senescence cells) наблюдалась полная дезорганизация актина (Рисунок 55, А) [16, 18]. Обработка клеток RНАММ-таргет пептидами индуцировала в них образование коротких актиновых филаментов, актиновые фибриллы располагались хаотично в цитоплазме, актин не накапливался на концах клетки, наблюдался стресс актиновых волокон, происходило нарушение целостности цитоплазматической мембраны клетки (Рисунок 55, А, Б) [16, 18].



**Рисунок 55** – Морфологические изменения актина в MDA-MB-231 клетках, обработанных пептидом EEDFGEEAEEEE. **А** – гигантская (senescence cell) биядерная клетка с дезорганизацией актина, хаотичным расположением коротких актиновых филаментов, **Б** – гигантская клетка старения с нарушенной целостностью лидирующего края клетки, **С** – мелкие инвазивные клетки с диффузной локализацией актина, нечетко выраженными инвадоподиями, незначительно деградирующие желатин. Увеличение  $\times 60$ .

Количественный анализ числа гигантских клеток на область изображения, показал, что клетки, необработанные пептидами, содержали большое количество гигантских клеток старения ( $\sim 13$  клеток на область изображения) (Рисунок 56). Однако клетки, обработанные RНАММ-таргет пептидами, демонстрировали меньшее количество гигантских клеток ( $\sim 3\text{--}5$  клеток на область изображения).

Эти данные указывают на то, что гигантские клетки (senescence cells) могут быть вовлечены в процесс развития инвазивности, а обработка клеток RНАММ-таргет пептидами препятствует их появлению. Это свидетельствует о том, что RНАММ-таргет пептиды обладают сенолитической активностью (senolytic, анти-возрастной). Возможно, что блокирование RНАММ с помощью пептидов нарушает его взаимодействие с мембранным белком супервиллином и приводит к уменьшению количества больших клеток, дезорганизации актина и снижению инвазивности [16, 494].



**Рисунок 56** – Конфокальные изображения и количественный анализ гигантских клеток в популяции клеточной линии MDA-MB-231: **1** – клетки MDA-MB-231 без добавления пептидов; **2** – клетки MDA-MB-231 + пептид EEDFGEEAEEEA; **3** – клетки MDA-MB-231 + пептид VEGEGEEEGEEY. \* –  $p \leq 0,05$  по отношению к контрольным клеткам без обработки пептидами.

На конфокальных изображениях видно, что инкубация клеток с RНАММ-таргет пептидами также приводит к различным морфологическим изменениям актина в маленьких клетках, обычно характеризующихся высокой инвазивностью [16]. После обработки пептидами эти мелкие клетки имели меньшее количество инвадоподий, у них пучки актиновых филаментов становились более тонкими и короткими, наблюдалась диффузная локализация актина в цитоплазме клетки. Кроме того, эти клетки после обработки пептидами, незначительно деградировали желатин по сравнению с контрольными клетками, необработанными пептидами (Рисунок 52, Б, С; Рисунок 55) [16, 18].

Таким образом, результаты данного исследования указывают на то, что блокирование RНАММ с помощью RНАММ-таргет пептидов приводит к ингибированию инвазивности кле-

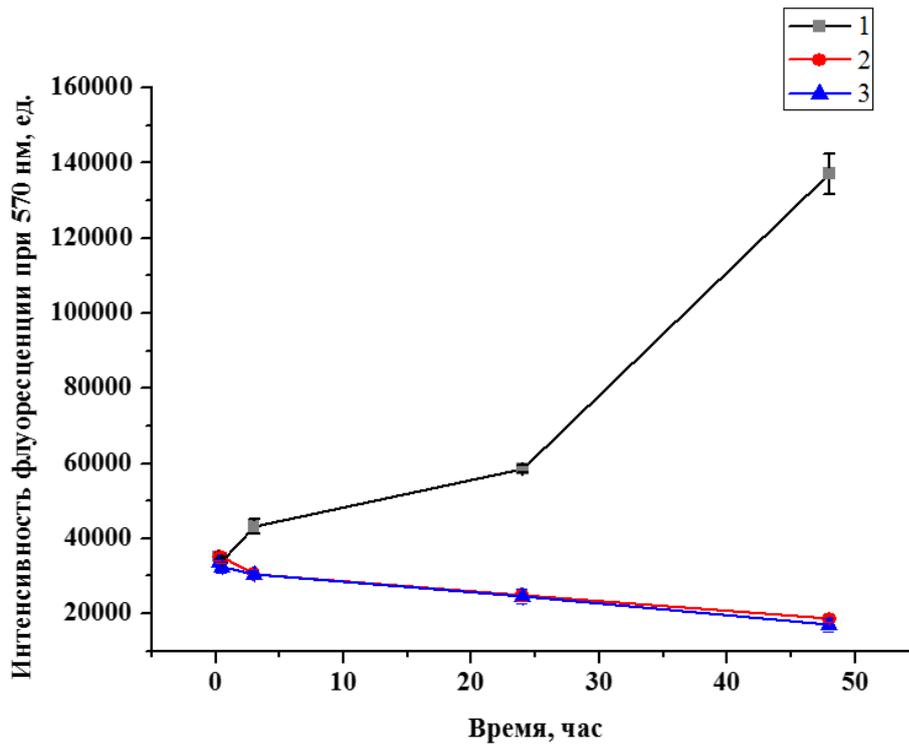
ток РМЖ и уменьшению клеток старения. Следовательно, RНАММ-таргет пептиды обладают антиметастатическим и сенолитическим потенциалом.

### **3.5. Исследование влияния RНАММ-таргет пептидов на жизнеспособность и пролиферацию клеток рака предстательной железы**

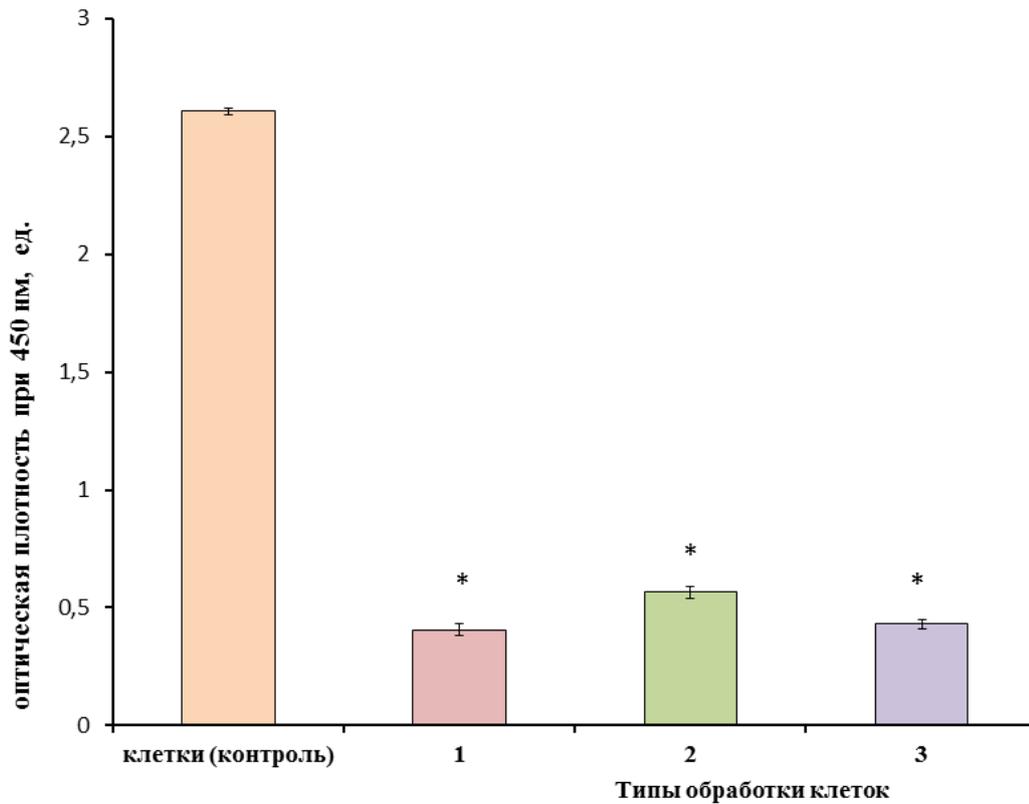
Ранее мы исследовали экспрессию RНАММ в клетках РПЖ (PC3m-LN4) и подтвердили повышенное содержание ГК и гиперэкспрессию RНАММ, а также HAS2 и HYAL1 в этих клетках [443]. Кроме того нами было установлено, что низкомолекулярные фрагменты ГК (6,2 и 10 кДа) связываются с RНАММ и влияют на пролиферацию и миграцию клеток PC3m-LN4. Анализ миграции клеток с использованием пептида-P15 подтвердил, что RНАММ, связываясь с низкомолекулярными фрагментами ГК, стимулирует агрессивное поведение опухоли, способствует образованию метастазов [2, 533]. Эти исследования подчеркивают важность повышенной фрагментации ГК, которая предполагает механизм, посредством которого ГК и HYAL1 влияют на микроокружение опухоли, способствуя прогрессии РПЖ. В целом полученные нами результаты подтвердили вывод о том, что повышенное содержание RНАММ и низкомолекулярной ГК является индикатором злокачественной прогрессии опухолей. Поэтому на следующем этапе исследования мы оценивали потенциал RНАММ-таргет пептидов, способных прерывать взаимодействия между низкомолекулярной ГК и RНАММ с целью с подавления пролиферации, выживаемости и метастазирования опухолевых клеток PC3m-LN4. Мы изучали влияние RНАММ-таргет пептидов на жизнеспособность и пролиферацию клеток рака предстательной железы (PC3m-LN4) [2, 20]. Клетки PC3m-LN4 обрабатывались пептидами при низкой концентрации 10 мкг/мл ( $2 \times 10^{-7}$  М) в течение 0,5; 3; 24 и 48 часов. Как видно на Рисунке 57, в интервале от 0 до 48 часов наблюдалось ингибирование жизнеспособности клеток, что сопровождалось снижением интенсивности флуоресценции клеток, обработанных пептидами, по отношению к контрольным клеткам. Результаты показали, что оба пептида (EEDFGEEAEAAA и VEGEGEEEGEEY) ингибировали жизнеспособность клеток РПЖ на ~ 90% через 48 часов (Рисунок 57) [2].

Анализ влияния пептидов на пролиферацию клеток РПЖ проводили методом BrdU assay, как описано в «Методах исследования» [1, 2]. Установлено, что RНАММ-таргет пептиды ( $2 \times 10^{-7}$  М) EEDFGEEAEAAA; VEGEGEEEGEEY и FTEAESNMNDLV подавляли пролиферацию клеток РПЖ в 4-5 раз (Рисунок 58) [20].

Таким образом, мы показали, что пептиды способны подавлять жизнеспособность и пролиферацию клеток предстательной железы значительно сильнее, чем клеток рака молочной железы [1]. Это свидетельствует о том, что клетки предстательной железы являются более чувствительными к обработке пептидами [1, 2].



**Рисунок 57** – Эффект RНАММ-таргет пептидов на жизнеспособность клеток рака простаты (PC3m-LN4) во времени: **1** – клетки PC3m-LN4; **2** – PC3m-LN4+пептид EEDFGEEAEEEE; **3** – PC3m-LN4+пептид VEGEGEEEGEEY.



**Рисунок 58** – Влияние RНАММ-таргет пептидов на пролиферацию PC3m-LN4 клеток: контроль-клетки PC3m-LN4; PC3m-LN4 + пептид EEDFGEEAEEEE (**1**); PC3m-LN4 + пептид VEGEGEEEGEEY(**2**), PC3m-LN4 + пептид FTEAESNMNDLV (**3**). \* –  $p \leq 0,05$  по отношению к контрольным клеткам без обработки пептидами.

### 3.5.1. Влияние RHAMM-таргет пептидов на апоптоз и некроз клеток рака предстательной железы

Для того чтобы понять, отчего наблюдается гибель клеток под воздействием пептидов, мы изучали влияние пептидов на апоптоз и некроз клеток рака предстательной железы [2, 14]. Для этого мы использовали ELISA PLUS Kit (Roche Diagnostic, USA), как описано в «Методах исследования» [14]. Следует отметить, что клетки, без обработки пептидами, показали небольшой уровень апоптоза, поскольку каждая экспоненциально растущая клеточная культура содержит некоторое количество мертвых клеток (в норме приблизительно 3%) вследствие спонтанной дифференциации и взросления клеточной линии [2]. Однако, обработка клеток пептидами показала, что RHAMM-таргет пептиды ( $2 \times 10^{-7}$  М) индуцировали апоптоз в PC3m-LN4 клетках, примерно, в 2 раза (Таблица 8) [2].

**Таблица 8** – Эффект RHAMM-таргет пептидов на апоптоз и некроз клеток PC3m-LN4, фибробластов и фибробластов RHAMM<sup>(-/-)</sup>. \* –  $p \leq 0,05$  по отношению к контрольным клеткам без обработки пептидами.

№	Тип клеток	Апоптоз (оптическая плотность при 405 нм, ед.)	Некроз (оптическая плотность при 405 нм, ед.)
1	PC3m-LN4	2,113	2,104
2	PC3m-LN4+пептид EEDFGEEAEEEE	3,440*	0,545*
3	PC3m-LN4+пептид VEGEGEEEGEEY	3,661*	0,655*
4	Фибробласты	0,644	2,429
5	Фибробласты+пептид EEDFGEEAEEEE	0,644	2,211
6	Фибробласты+пептид VEGEGEEEGEEY	0,645	2,259
7	Фибробласты RHAMM <sup>(-/-)</sup>	0,217	0,927
8	Фибробласты RHAMM <sup>(-/-)</sup> + пептид EEDFGEEAEEEE	0,199	0,829
9	Фибробласты RHAMM <sup>(-/-)</sup> + пептид VEGEGEEEGEEY	0,209	0,765

При исследовании эффекта пептидов на некроз PC3m-LN4 клеток выявлено, что оба пептида значительно ингибировали некротическую гибель клеток рака предстательной железы (приблизительно, в 4 раза, Таблица 8) [2].

Следует отметить, что в предыдущих экспериментах мы показали, что эти пептиды стимулировали некроз клеток рака молочной железы [2, 14]. Это свидетельствует о другом меха-

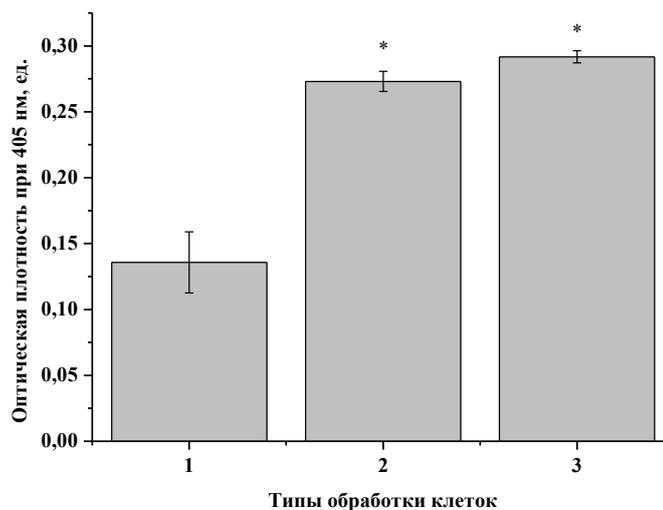
низме действия пептидов на клетки рака предстательной железы, чем на клетки рака молочной железы) [2, 14].

Чтобы понять, является ли действие пептидов специфичным только для опухолевых клеток, мы изучали влияние RHAMM-таргет пептидов на апоптоз и некроз нормальных фибробластов и фибробластов RHAMM<sup>(-/-)</sup>. Результаты показали, что RHAMM-таргет пептиды не оказывали эффекта на апоптоз и некроз нормальных клеток (Таблица 8). Оба пептида также практически не оказывали влияния на апоптоз и некроз фибробластов RHAMM<sup>(-/-)</sup> (Таблица 8). Наблюдаемые небольшие различия не были статистически значимыми [14].

Эти результаты продемонстрировали, что RHAMM-таргет пептиды обладают апоптотической активностью и их действие является RHAMM-опосредованным для клеток рака предстательной железы [2, 14].

### 3.5.2. Влияние RHAMM-таргет пептидов на активность каспаз-3/7 в клетках рака предстательной железы

На следующем этапе мы исследовали влияние RHAMM-таргет пептидов (EEDFGEEAEEEE и VEGEGEEEGEEY) на активность каспаз-3/7 в PC3m-LN4 клетках [1, 2, 15]. К клеткам добавляли RHAMM-таргет пептиды ( $2 \times 10^{-7}$  М) и инкубировали в течение 24 часов [2]. Результаты показали, что активность каспаз-3/7 увеличилась примерно в 2 раза в клетках, обработанных пептидами, по сравнению с контрольными необработанными клетками (Рисунок 59). Эти данные согласуются с индукцией апоптоза под воздействием пептидов в этих клетках [2, 14, 15].



**Рисунок 59** – Индукция активности каспаз-3/7 посредством RHAMM-таргет пептидов в клетках рака простаты (PC3m-LN4): **1** – PC3m-LN4; **2** – PC3m-LN4+пептид EEDFGEEAEEEE; **3** – PC3m-LN4+пептид VEGEGEEEGEEY. \* –  $p \leq 0,05$  по отношению к контрольным клеткам без обработки пептидами.

Таким образом, наши результаты показали, что RНАММ-таргет пептиды ингибировали жизнеспособность и стимулировали апоптоз клеток рака предстательной железы [14, 15]. Эти данные позволяют предположить, что RНАММ-таргет пептиды являются перспективными кандидатами для терапии рака предстательной железы.

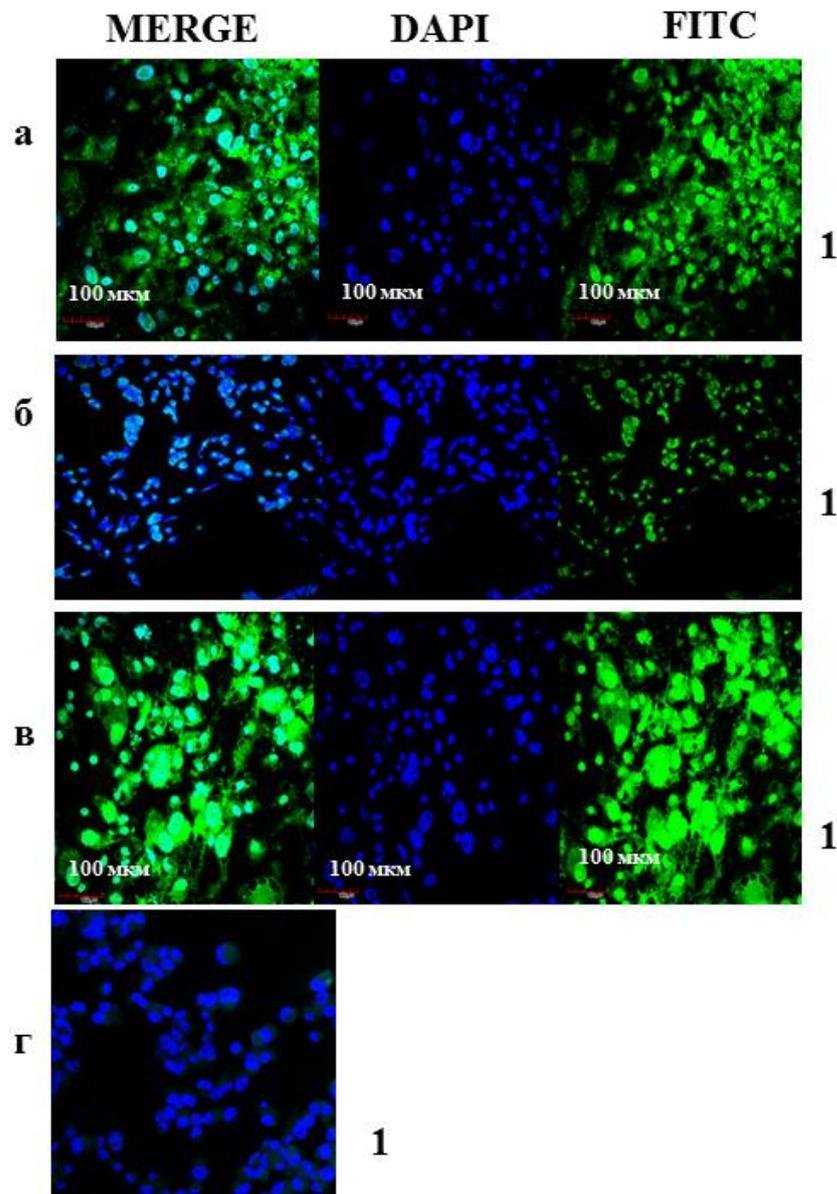
### **3.6. Ингибирование инвазивности клеток рака предстательной железы под действием пептидов (GEGEEGEE и DFGEEAEE)**

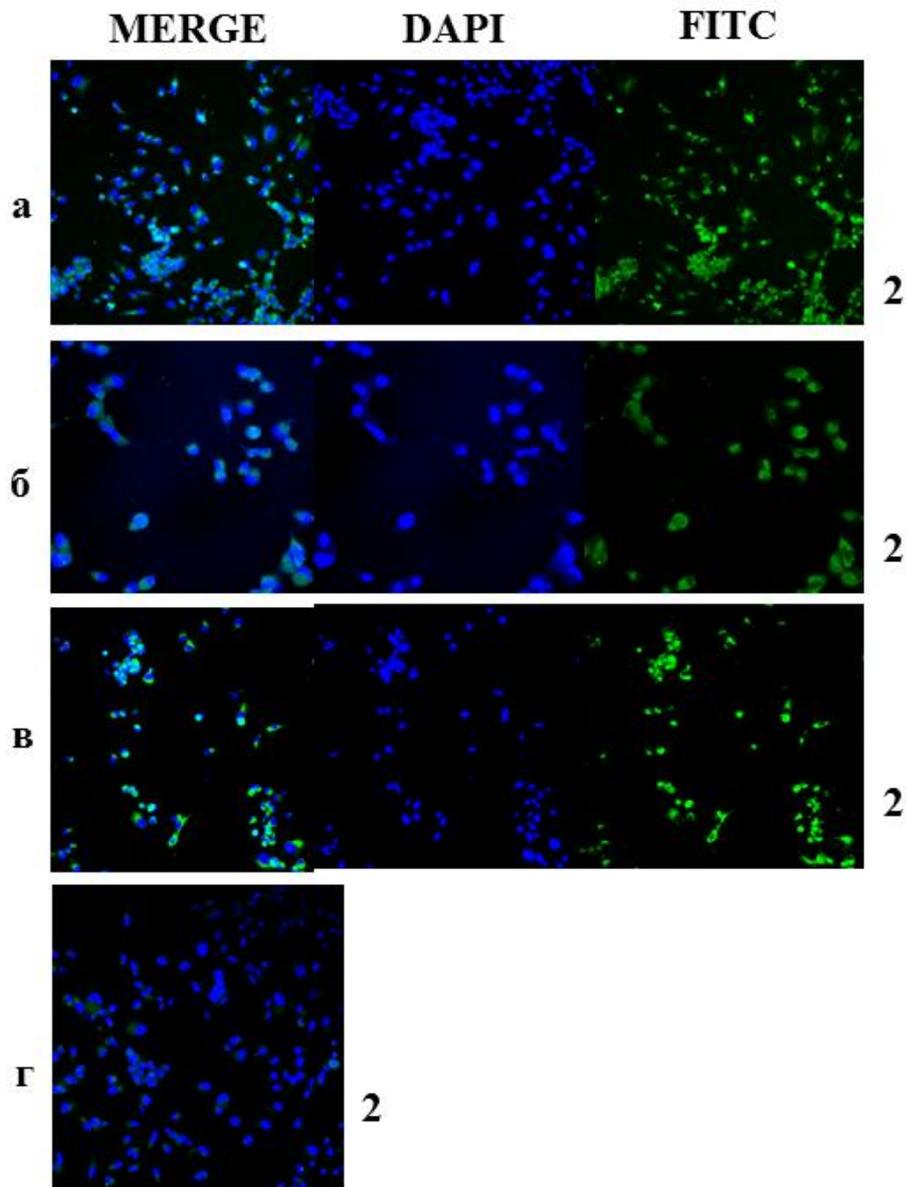
#### **3.6.1. Изучение связывания пептидов (FITC-GEGEEGEE и FITC-DFGEEAEE) с клетками рака предстательной железы**

Мы исследовали связывание FITC-пептидов с клетками предстательной железы (PC3m-LN4). В эксперименте мы использовали 8-ми мерные пептиды (GEGEEGEE и DFGEEAEE), которые представляют собой укороченные версии пептидов (VEGEGEEEGEEY и EEDFGEEAEEEA) [15, 443]. Следует отметить, что эти пептиды содержат в своем составе консервативный фрагмент EEXEEZ. Поэтому нам было интересно исследовать, способны ли эти пептиды также связываться с RНАММ [15].

Клетки обрабатывали с FITC-пептидами согласно методу, описанному в «Методах исследования» и анализировали связывание пептидов методом конфокальной флуоресцентной микроскопии [15]. Результаты показали, что оба FITC-пептида связываются с клетками, однако, связывание FITC-GEGEEGEE пептида было немного сильнее, чем FITC-DFGEEAEE (Рисунок 60, а, ряд 1, 2) [15]. Для идентификации рецептора, связывающего пептиды, мы исследовали блокирование клеточной поверхности тремя различными антителами, а именно, анти-FcR, анти-CD44 и анти-RНАММ антителами. Результаты показали, что предварительная инкубация клеток с анти-IgG антителами, которые связываются с FcR рецептором и тем самым блокируют его, не приводила к заметному изменению флуоресценции по отношению к клеткам без обработки (Рисунок 60, а, ряд 1, 2) и, таким образом, не влияла на связывание пептидов с клетками (Рисунок 60, б) [15]. Эти результаты указывают на то, что пептиды не связываются с FcR рецептором клеток. Предварительная обработка PC3m-LN4 клеток с анти-CD44 антителами, которые связываются с CD44 рецептором (Рисунок 60, в), также не влияла на уровень флуоресценции клеток по отношению к клеткам без обработки (Рисунок 60, а, ряд 1, 2). Эти данные указывают на то, что пептиды не связываются с CD44 рецептором. Однако предварительная инкубация клеток с анти-RНАММ антителами с последующим добавлением пептидов приводила к полному отсутствию флуоресценции (Рисунок 60, г). Эти результаты свидетельствуют о том, что FITC-GEGEEGEE и FITC-DFGEEAEE пептиды связываются именно с RНАММ рецептором на поверхности клеток рака предстательной железы [15].

Количественный анализ связывания FITC-GEGEEGEE или FITC-DFGEEAEE пептидов с клетками проводили с помощью ImageJ программы (Рисунок 61). Как видно из Рисунка 61, FITC-GEGEEGEE пептид показал величину флуоресценции 51, а пептид FITC-DFGEEAEE – величину 45, то есть связывание пептида FITC-GEGEEGEE немного выше, чем пептида DFGEEAEE [15, 19]. Однако данные различия в интенсивности флуоресценции между пептидами не являются статистически значимыми [15, 19]. В то же время данные значения флуоресценции (51 и 45) являются статистически значимыми по сравнению с величинами флуоресценции после обработки клеток анти-RHAMM антителами (10 и 8), что указывает на связывание пептидов с RHAMM рецептором. Эксперименты по предварительной инкубации клеток с анти-FcR антителами (IgG антитела) и анти-CD44 антителами проводили в качестве сравнения, чтобы показать, что блокирование FcR и CD44 рецепторов не мешает FITC-пептидам связываться с клетками.

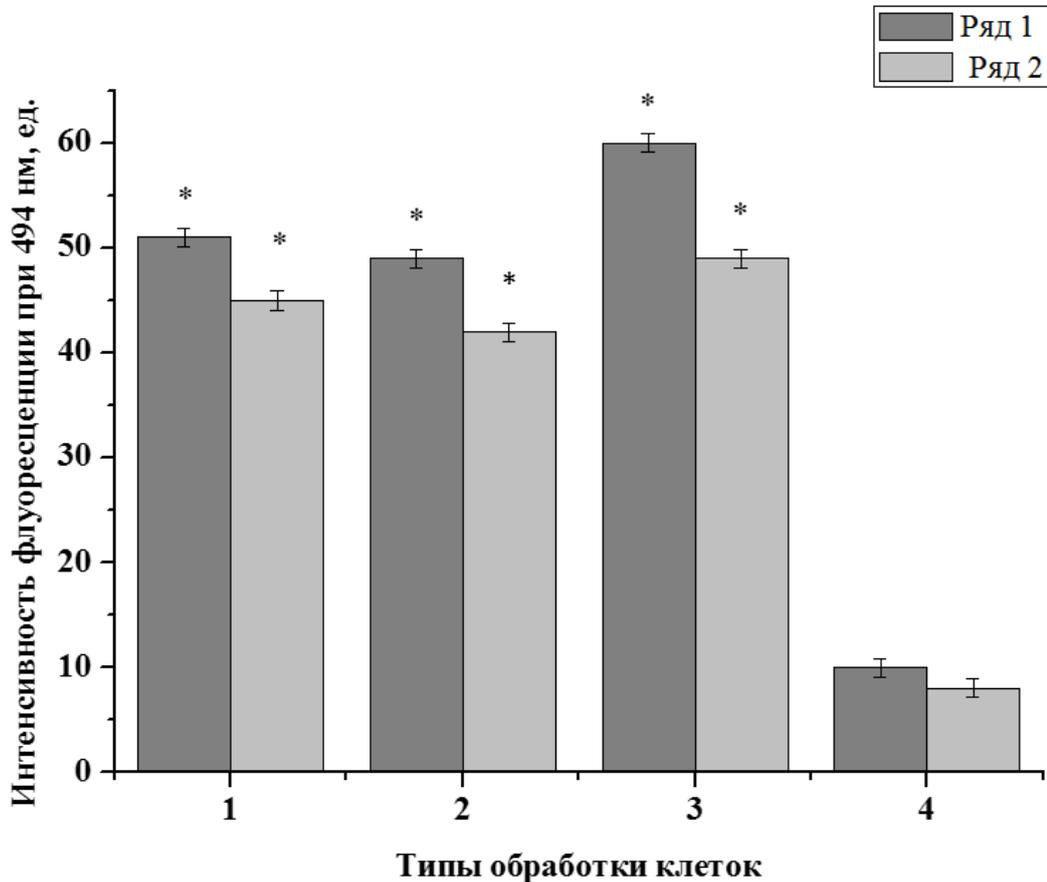




**Рисунок 60** – Связывание FITC-GEGEEGEE (1) и FITC-DFGEEAEE (2) пептидов с клетками: **а** – клетки PC3m-LN4, обработанные FITC-пептидами; **б** – клетки PC3m-LN4, предварительно обработанные анти-FcR-антителами; **в** – клетки PC3m-LN4, предварительно обработанные анти-CD44-антителами; **г** – клетки PC3m-LN4, предварительно обработанные анти-RHAMM-антителами. Результаты регистрировали при Ex/Em = 358/461 нм (флуоресценция DAPI) и Ex/Em = 495/519 нм (флуоресценция FITC).

Количественный анализ интенсивности флуоресценции после обработки IgG антителами показал величины 49 и 42, которые сопоставимы с величинами 51 и 45 для пептидов FITC-GEGEEGEE и FITC-DFGEEAEE без обработки клеток антителами. Сравнительный анализ интенсивности флуоресценции после обработки анти-CD44 антителами показал величины 60 и 49, которые также сопоставимы с величиной 51 (для пептида FITC-GEGEEGEE) и величиной 45 (для пептида FITC-DFGEEAEE) без обработки антителами [15, 19]. Различия между этими тремя типами обработки клеток являются статистически незначимыми. Эти результаты свидетельствует о том, что оба пептида не связываются ни с FcR рецептором, ни с CD44 рецептором. Ве-

личины интенсивности флуоресценции являются статистически значимыми лишь по отношению к величинам флуоресценции после обработки клеток анти-RHAMM антителами (10 и 8). Как видно из Рисунка 60, предварительная обработка клеток с анти-RHAMM антителами приводила к значительному ингибированию связывания пептидов с поверхностью клеток.

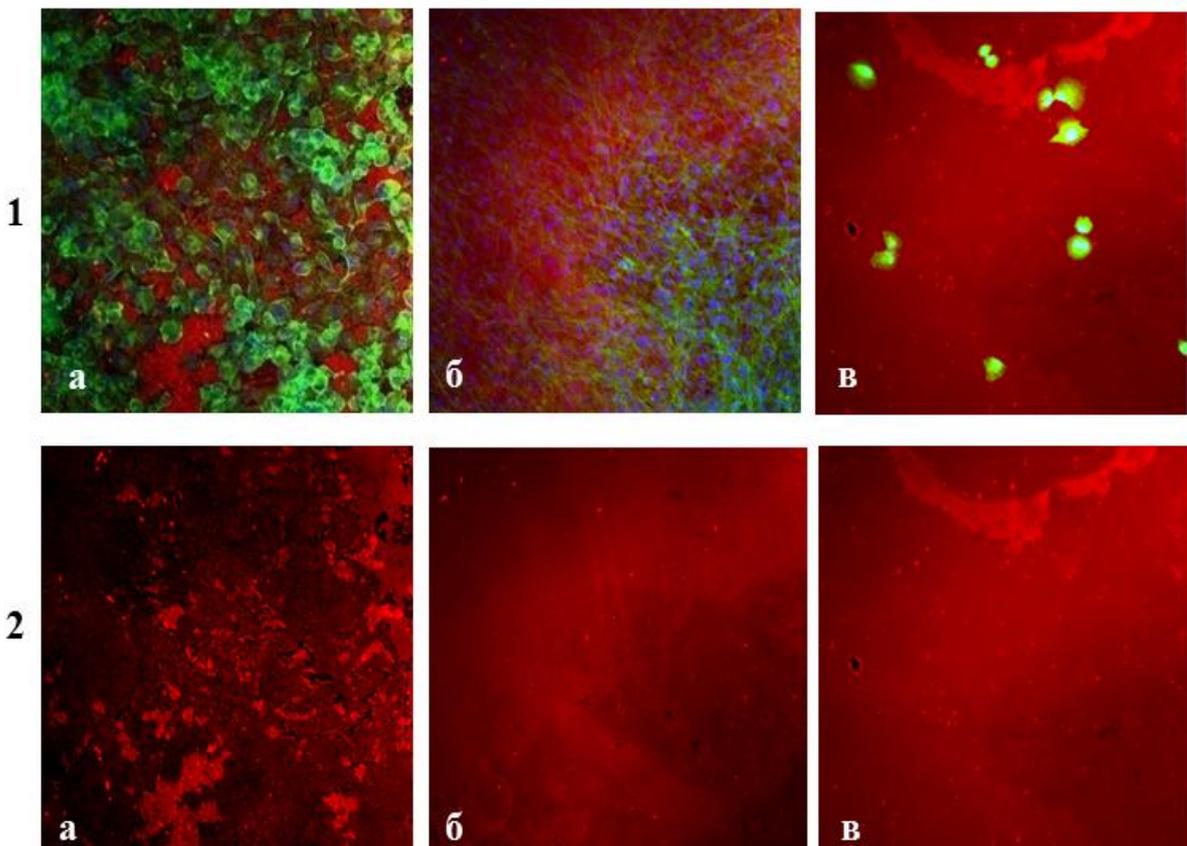


**Рисунок 61** – Количественный анализ связывания FITC-GEGEEGEE (ряд 1) и FITC-DFGEEAEE (ряд 2) пептидов с PC3m-LN4 клетками: **1** – клетки PC3m-LN4; **2** – клетки PC3m-LN4 + анти-IgG антитела; **3** – клетки PC3m-LN4 + анти-CD44 антитела; **4** – клетки PC3m-LN4+анти-RHAMM антитела. С помощью программного обеспечения ImageJ, ROI раковых клеток (общее количество клеток 6 150) были выбраны. Среднее значение флуоресценции каждого ROI было получено с использованием 8-битных изображений и представлено в виде гистограммы. Данные были проанализированы с помощью One-Way ANOVA. Различия считали статистически значимыми при \* –  $p \leq 0,05$ .

Таким образом, количественный анализ всех данных свидетельствует о том, что FITC-пептиды (GEGEEGEE и DFGEEAEE) селективно связываются с RHAMM рецептором на поверхности опухолевых клеток PC3m-LN4. Кроме того мы показали, что короткие пептиды, содержащие в своем составе фрагмент EEXEEZ, сохраняют способность специфично связываться с RHAMM. Это подтверждает важную роль этого фрагмента [15, 16].

### 3.6.2. Сравнительный анализ инвазивности клеток рака предстательной железы, мышечных эмбриональных фибробластов и клеток меланомы кожи

Мы проводили сравнительный анализ инвазивности раковых клеток предстательной железы, мышечных эмбриональных фибробластов и опухолевых клеток меланомы кожи [15]. С этой целью PC3m-LN4 клетки высевали на Су3-флуоресцеин-желатиновые подложки, затем добавляли только ростовую среду (DMEM, контроль) и клетки выращивали в течение 40 часов. Для контроля также высевали фибробласты (MEF, неинвазивные) и клетки меланомы кожи (WM1552с, неинвазивные) на Су3-флуоресцеин-желатиновые подложки в ростовой среде. После фиксации и окраски клеток согласно протоколу, описанному в «Методах исследования», получали изображения на конфокальном микроскопе и анализировали площадь деградации желатина клетками. Чтобы оценить инвазивность клеток, проводили анализ деградации желатина клетками через 40 часов. На конфокальных изображениях видно, что PC3m-LN4 клетки интенсивно деградируют Су3-флуоресцентно-меченый желатин (Рисунок 62, а, ряд 1) [15].

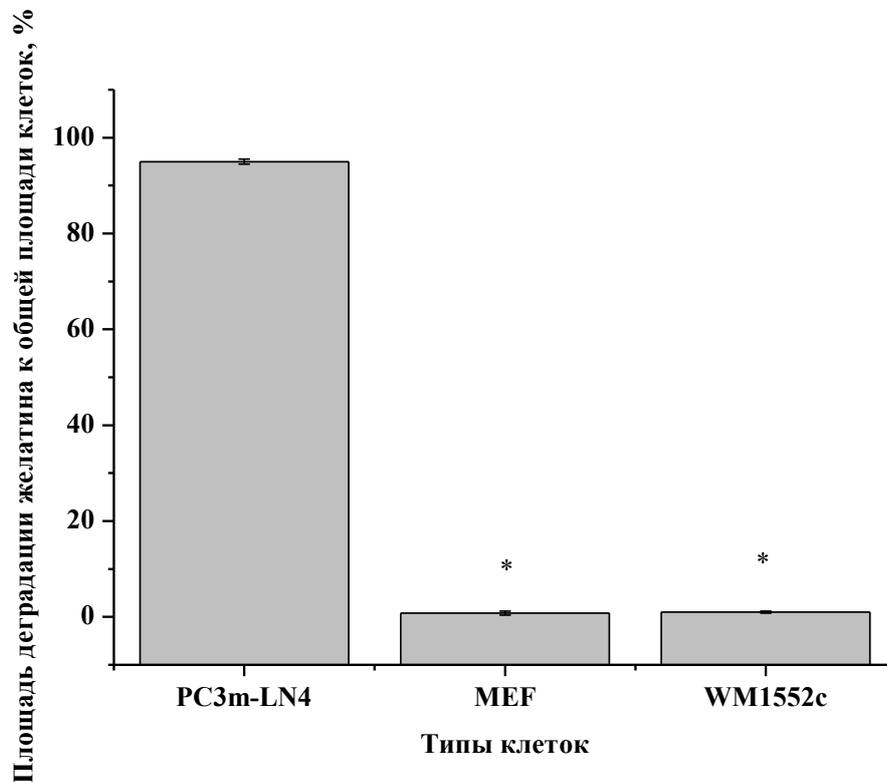


**Рисунок 62** – Анализ инвазивности клеток РПЖ, фибробластов и клеток кожной меланомы. Конфокальные изображения клеток (**1**) и деградации желатина (**2**): **а**) PC3m-LN4 клетки; **б**) MEF клетки; **в**) WM1552с клетки. Желатин окрашен красителем Су3 (красная флуоресценция), ядро клеток окрашено DAPI (синяя флуоресценция), актин клеток окрашен красителем FITC-фаллоидином (зеленая флуоресценция). Увеличение  $\times 20$ .

Для инвазивных PC3m-LN4 клеток наблюдается протеолиз желатина, относящийся к образованию инвадоподий в виде областей, в которых отсутствует флуоресценция желатина, на конфо-

кальных изображениях эта область черного цвета (Рисунок 62, а, ряд 2). Инвазивные клетки имеют большое количество инвадоподий, высокую концентрацию актина на концах клетки. Для сравнения инвазивности опухолевых и нормальных клеток, также анализировали инвазивность фибробластов (MEF) и клеток меланомы кожи (WM1552с) через 40 часов (Рисунок 62,б, в, ряд 1). Как видно, фибробласты и клетки меланомы кожи не деградировали желатин, что указывает на отсутствие инвазивности в нормальных клетках (фибробластах) и раковых клетках меланомы, которые являются неинвазивными и не образуют инвадоподий (Рисунок 62, б, в, ряд 2).

Количественный анализ изображений проводили, используя программу ImageJ software. Мы показали, что PC3m-LN4 клетки деградировали желатин на 95% через 40 часов, в то же время фибробласты деградировали желатин на 1%, а клетки меланомы на 0,8% (Рисунок 63) [15]. Наблюдаемый незначительный уровень деградации желатина обусловлен небольшой подвижностью фибробластов и клеток меланомы [15].

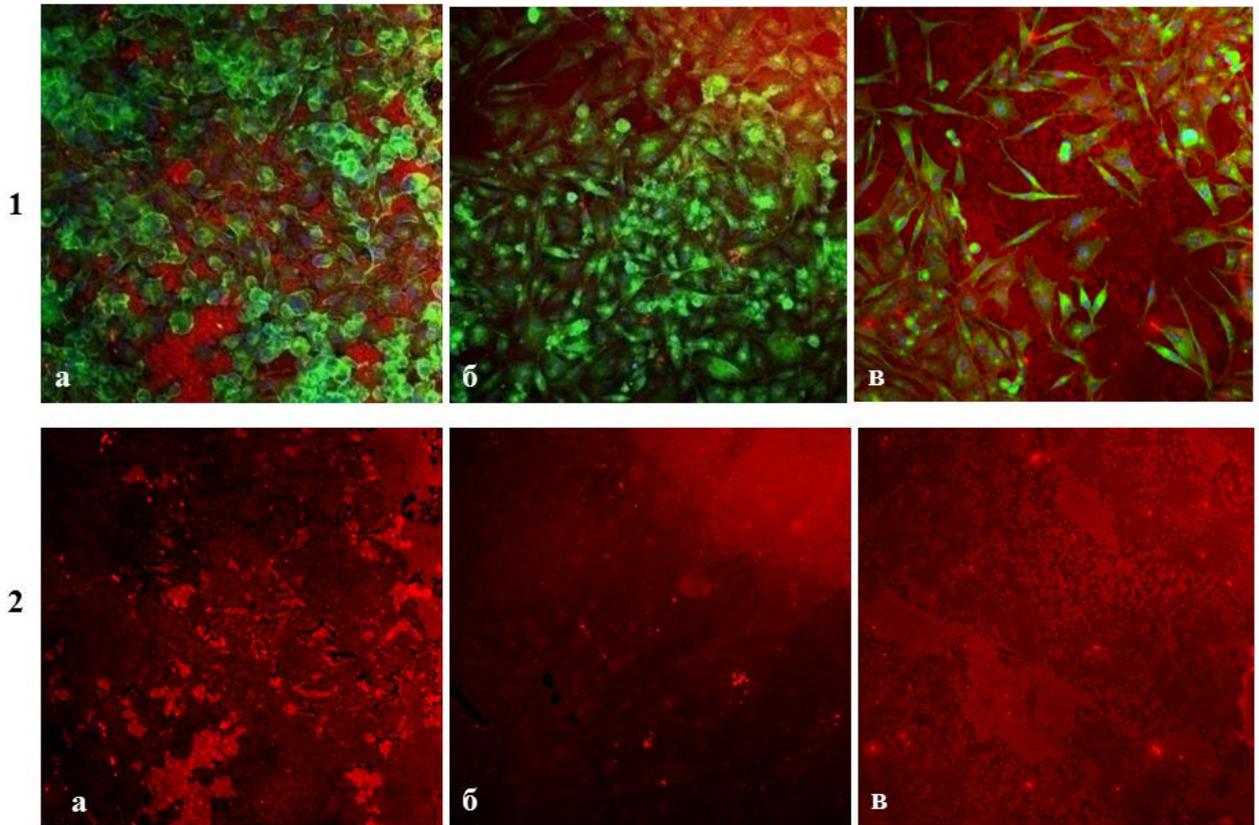


**Рисунок 63** – Количественный анализ деградации желатина раковыми клетками PC3m-LN4, фибробластами (MEF) и клетками меланомы кожи (WM1552с), с помощью ImageJ программы. \* –  $p \leq 0,05$  по отношению к клеткам PC3m-LN4.

### 3.6.3. Эффект RHAMM-таргет пептидов на инвазивность клеток РПЖ

Для того чтобы анализировать эффект RHAMM-таргет пептидов на инвазивность опухолевых клеток, PC3m-LN4 клетки предварительно обрабатывали пептидами GEGEEGEE и DFGEEAEE [15]. Результаты показали, что обработка клеток пептидами приводила к значи-

тельному уменьшению площади деградации желатина по сравнению с клетками без инкубации с пептидами (Рисунок 64, а, б, в, ряд 1) [15].

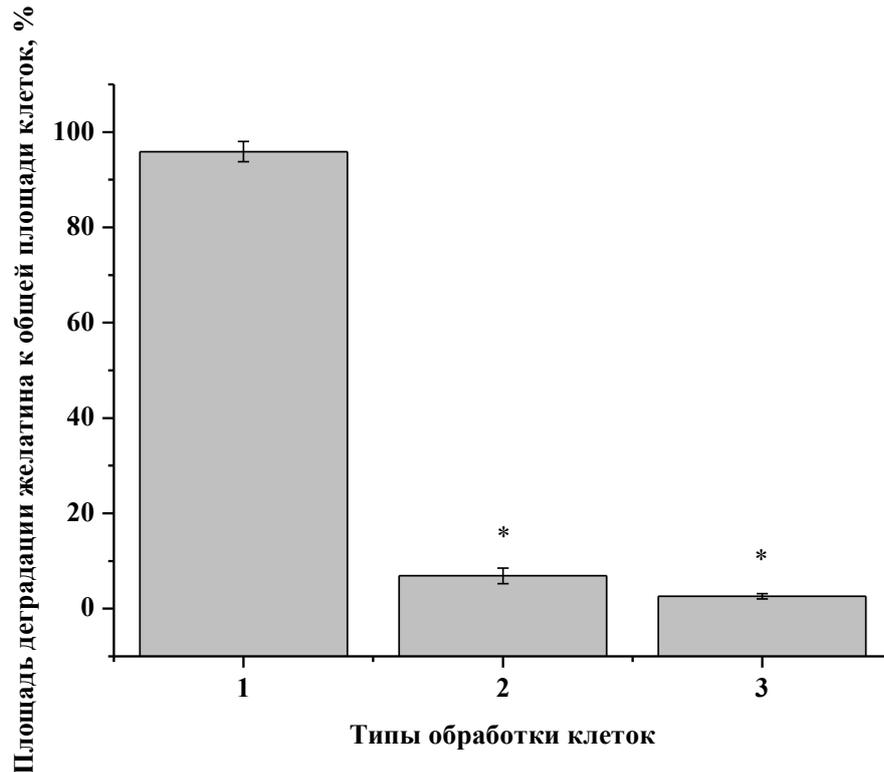


**Рисунок 64** – Эффект пептидов на инвазивность клеток PC3m-LN4. Конфокальные изображения клеток (1) и деградации желатина (2): а) PC3m-LN4 без добавления пептидов; б) PC3m-LN4, обработанные GEGEEGEE пептидом; в) PC3m-LN4, обработанные DFGEEAEE пептидом. Желатин окрашен красителем СуЗ (красная флуоресценция), ядро клеток окрашено DAPI (синяя флуоресценция), актин клеток окрашен красителем FITC-фаллоидином (зеленая флуоресценция). Увеличение  $\times 20$ .

Область черного цвета (отсутствие флуоресценции) резко сокращалась, что указывает на уменьшение числа инвадоподий и на ингибирование инвазивности раковых клеток (Рисунок 64, б, в, ряд 2). Количественный анализ площади деградации желатина с помощью ImageJ software показал, что клетки, обработанные пептидом GEGEEGEE, деградировали только 7% площади желатина по отношению к общей площади клеток, что свидетельствует о том, что инвазивность клеток РПЖ уменьшилась на 93% (Рисунок 65) [15].

Клетки, обработанные пептидом DFGEEAEE, деградировали лишь 11% желатина. Этот результат указывает на то, что предварительная обработка клеток пептидом DFGEEAEE приводила к снижению инвазивности на 89% (Рисунок 65).

Эти результаты показали, что синтетические пептиды (GEGEEGEE и DFGEEAEE) эффективно ингибировали образование инвадоподий в раковых клетках.



**Рисунок 65** – Количественный анализ деградации желатина PC3m-LN4 клетками с помощью ImageJ программы: **1** – клетки без обработки пептидами, **2** – клетки, предварительно обработанные пептидом GEGEEGEE, **3** – клетки, предварительно обработанные пептидом DFGEEAEE. \* –  $p \leq 0,05$  по отношению к клеткам без обработки пептидами.

Таким образом, это свидетельствует о том, что RHAMM-таргет пептиды являются перспективными кандидатами для блокирования процессов инвазивности и метастазирования клеток РПЖ.

### 3.7. Визуализация клеток рака яичников с помощью пептида VEGEGEEEEGEEY

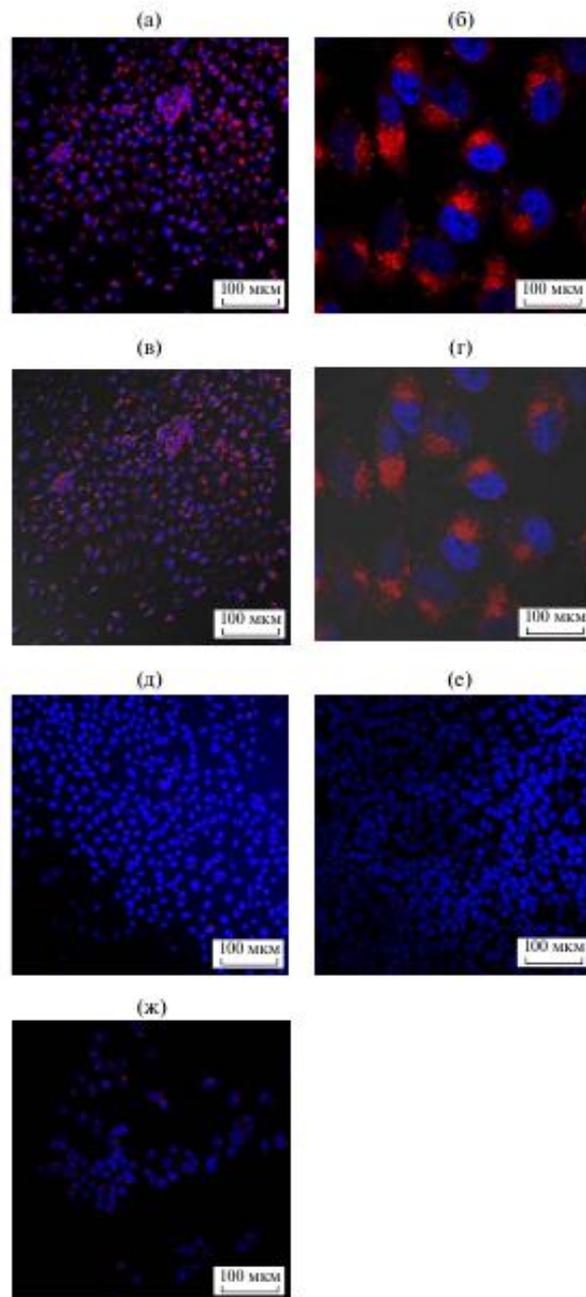
В настоящее время разработка неинвазивных методов диагностики рака яичников на самой ранней стадии является весьма актуальной. Для того чтобы неинвазивная визуализация опухолевых клеток *in vivo* стала осуществимой, необходима разработка правильно сконструированных зондов для визуализации.

Задачей данного исследования было изучение возможности использования VEGEGEEEEGEEY-пептида в качестве визуализирующего зонда для диагностики рака яичников. Ранее было показано, что содержание ГК и RHAMM повышено при раке яичников и коррелирует с прогрессией и метастазированием опухоли [604].

Однако в литературе отсутствуют данные о взаимодействии ГК с клетками рака яичников. Поэтому в данной работе мы вначале исследовали связывание ГК с клетками рака яичников. Затем мы изучили связывание VEGEGEEEEGEEY-пептида с RHAMM на поверхности опухолевых клеток.

### 3.7.1. Связывание ГК-Су5.5 с поверхностью клеток рака яичников

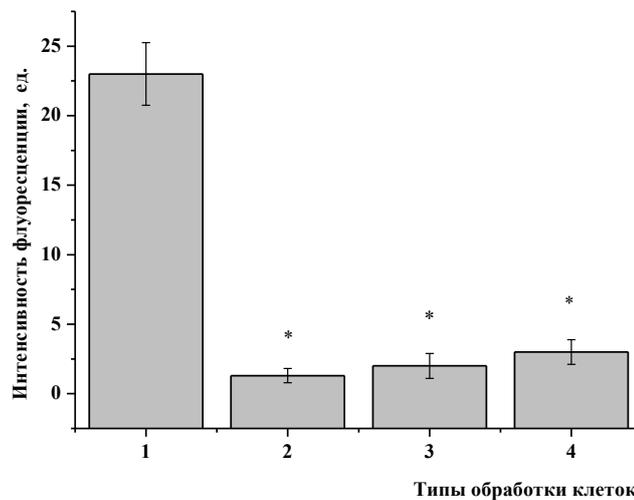
Вначале мы исследовали связывание флуоресцентно-меченой ГК-Су5.5 (220 кДа) с поверхностью клеток рака яичников (SKVO3), которые характеризуются повышенной экспрессией RНАММ. Методом конфокальной микроскопии установлено, что при добавлении ГК-Су5.5 к клеткам SKVO3 наблюдалась интенсивная флуоресценция (величина флуоресценции была равна 23 ед. (Рисунок 66, а–г; Рисунок 67 (1)) [526].



**Рисунок 66** – Связывание ГК-Су5.5 на поверхности клеток рака яичников: **а** – клетки SKVO3, обработанные ГК-Су5.5; **б** – изображение **а** при увеличении  $\times 40$ ; **в** – 3-х мерное изображение клеток SKVO3, обработанных ГК-Су5.5; **г** – 3-х мерное изображение клеток SKVO3, обработанных ГК-Су5.5 при увеличении  $\times 40$ ; **д** – клетки, предварительно обработанные анти-RНАММ-Ab; **е** – клетки, предварительно обработанные немеченой ГК; **ж** – клетки, предварительно обработанные VEGEGEEEGEEY-пептидом. Результаты регистрировали при  $E_x/E_m = 358/461$  нм (флуоресценция DAPI) и  $E_x/E_m = 675/694$  нм (флуоресценция Су5.5).

Это указывает на то, что ГК-Су5.5 эффективно связывалась с поверхностью клеток рака яичников. Связывание ГК-Су5.5 блокировалось анти-RHAMM антителами, поскольку при этом регистрировалось заметное снижение флуоресценции (интенсивность флуоресценции уменьшалась до 1,3 ед.). Это свидетельствует о том, что ГК-Су5.5 специфично связывается с RHAMM на поверхности клеток SKVO3 (Рисунок 66, д; Рисунок 67 (2)). Предварительная обработка клеток избытком немеченой ГК приводила к значительному уменьшению флуоресценции (интенсивность флуоресценции понижалась до 2 ед.), что указывает на связывание ГК-Су5.5 (Рисунок 66, е; Рисунок 67 (3)) именно с ГК-связывающим центром RHAMM рецептора [19]. Мы также показали, что предварительная инкубация клеток с немеченым VEGEGEEEGEEY-пептидом приводила к заметному понижению флуоресценции (интенсивность флуоресценции уменьшалась до 3 ед.), что свидетельствует о связывании пептида на ГК-связывающем центре RHAMM (Рисунок 66, ж; Рисунок 67 (4)).

Таким образом, эти данные указывают на то, что ГК-Су5.5 специфично связывается с RHAMM [19]. Количественный анализ связывания ГК-Су5.5 с поверхностью клеток рака яичников проводили, используя программу ImageJ (Рисунок 67). Нами были выбраны области изображения (ROI, region of interest) опухолевых клеток, общее количество проанализированных клеток составило 4150.



**Рисунок 67** – Количественный анализ связывания ГК-Су5.5 с поверхностью клеток рака яичников. **1** – ГК-Су5.5, **2** – ГК-Су5.5 + анти-RHAMM-антитела, **3** – ГК-Су5.5 + ГК, **4** – ГК-Су5.5 + VEGEGEEEGEEY-пептид. Среднее значение флуоресценции получено с использованием 8-битных изображений. Различия считали статистически значимыми при \* –  $p \leq 0,05$ .

### 3.7.2. Связывание VEGEGEEEGEEY пептида с RHAMM на поверхности клеток рака яичников

С целью возможности использования пептида для визуализации клеток рака яичников, мы исследовали связывание VEGEGEEEGEEY пептида с RHAMM на поверхности клеток рака яичников SKVO3, которые отличаются сверхэкспрессией RHAMM [19]. Для этого мы метили пептид

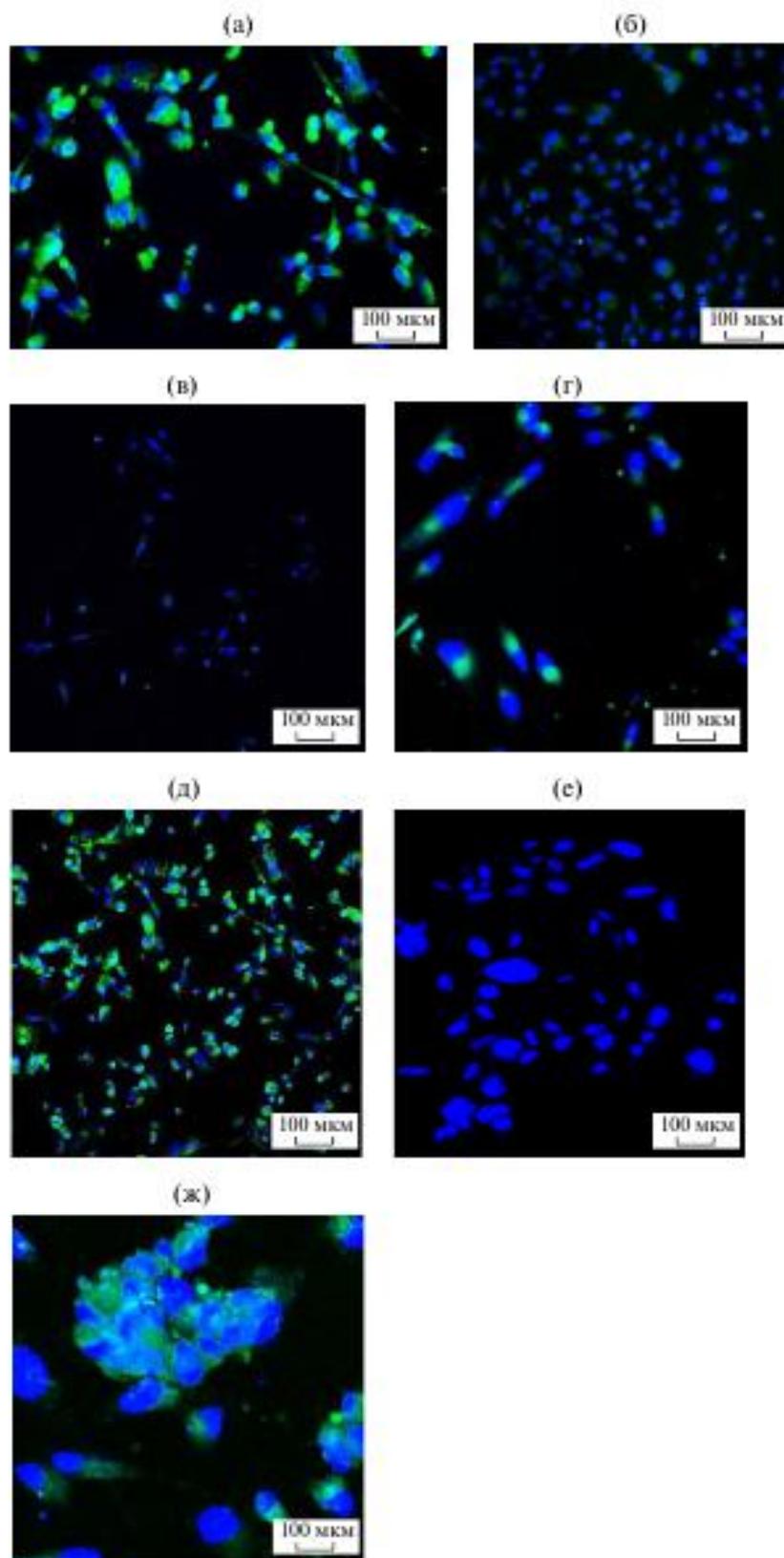
флуоресцентным красителем и анализировали связывание FITC-VEGEGEEEGEEY пептида методом конфокальной флуоресцентной микроскопии. Показано, что FITC-VEGEGEEEGEEY пептид эффективно связывался с поверхностью клеток рака яичников, о чем свидетельствует высокий уровень флуоресценции в клетках (интенсивность флуоресценции составляет 52 ед., Рисунок 68, а).

В качестве контроля сравнения мы также инкубировали с FITC-VEGEGEEEGEEY пептидом мышинные эмбриональные фибробласты (MEF, нормальные клетки). Результаты показали низкий уровень флуоресценции в нормальных клетках (величина флуоресценции равна 4 ед.), что указывает на незначительное связывание FITC-VEGEGEEEGEEY пептида с поверхностью этих клеток (Рисунок 68, б) [15, 19]. Это свидетельствует о том, что FITC-VEGEGEEEGEEY пептид адресно связывался с поверхностью клеток рака яичников [15].

Чтобы подтвердить связывание FITC-VEGEGEEEGEEY пептида с RНАММ, клетки SKVO3 предварительно инкубировали с анти-RНАММ антителами, а затем добавляли пептид. Показано, что после такой обработки уровень флуоресценции клеток значительно понизился (величина флуоресценции снизилась до 1,3 ед.) [15, 19]. Эти данные указывают на то, что FITC-VEGEGEEEGEEY пептид связывался именно с поверхностным RНАММ (Рисунок 68, в). Следует отметить, что предварительная инкубация клеток SKVO3 с анти-IgG антителами не приводила к заметному изменению флуоресценции. Интенсивность флуоресценции оставалась на том же уровне (46 ед.) по отношению к клеткам без блокирования. Таким образом, мы показали, что обработка клеток анти-IgG антителами не влияла на связывание FITC-VEGEGEEEGEEY-пептида с поверхностью клеток (Рисунок 68, г), так как эти антитела взаимодействуют с рецептором FcR, а не с RНАММ.

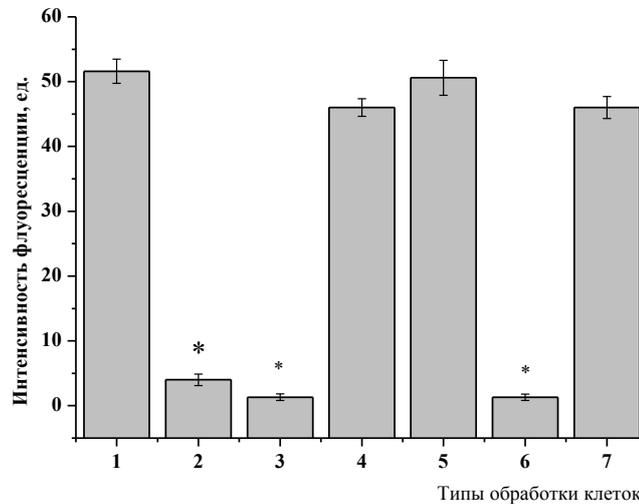
Кроме того было обнаружено, что предварительная инкубация клеток с анти-CD44 антителами также не влияла на уровень флуоресценции клеток по отношению к клеткам без добавок (интенсивность флуоресценции составила 50,6 ед., Рисунок 68, д) [15,19]. Это свидетельствует о том, что FITC-VEGEGEEEGEEY пептид не связывался с рецептором CD44, а специфично взаимодействовал с RНАММ на поверхности клеток рака яичников.

Чтобы подтвердить эти результаты, мы также анализировали связывание FITC-VEGEGEEEGEEY пептида с фибробластами RНАММ<sup>(-/-)</sup> и трансфицированными фибробластами RНАММ<sup>(+/+)</sup>. Показано, при отсутствии RНАММ в клетках уровень флуоресценции был незначительным (1,3 ед.), т.е. FITC-VEGEGEEEGEEY-пептид не связывался с поверхностью фибробластов RНАММ<sup>(-/-)</sup> (Рисунок 68, е). В то же время, пептид эффективно связывался с фибробластами, трансфицированными RНАММ<sup>(+/+)</sup>, о чем свидетельствует интенсивная флуоресценция (уровень флуоресценции был 46 ед.). Это подтверждает, что FITC-VEGEGEEEGEEY пептид связывается именно с RНАММ (Рисунок 68, ж) [2].



**Рисунок 68** –Связывание FITC-VEGEGEEEGEEY-пептида с RHAMM в клетках: **а** – клетки SKVO3, обработанные FITC-пептидом; **б** – эмбриональные фибробласты мыши, обработанные FITC-пептидом; **в** – клетки SKVO3, предварительно обработанные анти-RHAMM-Ab; **г** – клетки SKVO3, предварительно обработанные IgG-Ab; **д** – клетки SKVO3, предварительно обработанные анти-CD44-Ab; **е** – фибробласты RHAMM<sup>(-/-)</sup>, обработанные FITC-пептидом; **ж** – фибробласты RHAMM<sup>(+/+)</sup>, обработанные FITC-пептидом. Интенсивность флуоресценции регистрировали при  $E_x/E_m = 358/461$  нм (флуоресценция DAPI) и  $E_x/E_m = 495/519$  нм (флуоресценция FITC).

На Рисунке 69 представлен количественный анализ связывания FITC-VEGEGEEEGEEY пептида с поверхностью клеток SKOV3 [19].



**Рисунок 69** – Количественный анализ связывания FITC-VEGEGEEEGEEY пептида с поверхностью клеток SKOV3. **1** – SKOV3+FITC-пептид, **2** – FITC-пептид+ клетки MEF, **3** – SKOV3+FITC-пептид+анти-RHAMM-Ab, **4** – SKOV3+FITC-пептид+IgG-Ab, **5** – SKOV3+FITC-пептид+CD44-Ab, **6** – FITC-пептид+фибробласты RHAMM<sup>(-/-)</sup>, **7** – FITC-пептид+фибробласты RHAMM<sup>(+/+)</sup>. Среднее значение интенсивности флуоресценции для каждой области исследования получено с использованием 8-битных изображений. Статистический анализ данных проводили методом One Way ANOVA, различия считали статистически значимыми при \* –  $p \leq 0,05$ .

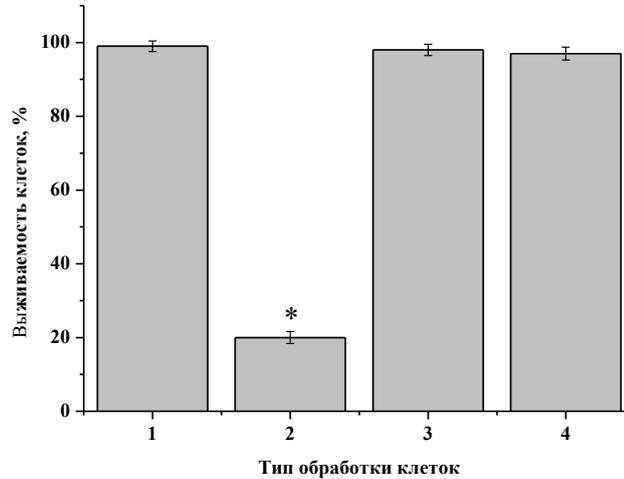
Таким образом, полученные результаты указывают на специфичность связывания FITC-VEGEGEEEGEEY пептида с RHAMM и позволяют сделать вывод, что этот пептид можно использовать в качестве молекулярного зонда для ранней диагностики рака яичников.

### 3.8. Исследование влияния пептида RYQLHPYR на жизнеспособность клеток рака предстательной железы

Для исследования мы выбрали пептид RYQLHPYR, который не содержит в своем составе общий для других пептидов фрагмент EEXEEZ, однако он также способен связываться с RHAMM, как было показано нами ранее [1]. Мы попытались выснить, сохраняет ли пептид с такой аминокислотной последовательностью свои функции в клетке. Задачей данного исследования было оценить влияние пептида RYQLHPYR на жизнеспособность, апоптоз, некроз и инвазивность клеток рака предстательной железы [1].

Вначале мы измеряли эффект пептида RYQLHPYR на жизнеспособность клеток рака предстательной железы (PC3m-LN4), для которых ранее нами была показана повышенная экспрессия RHAMM рецептора [1, 2, 443]. С этой целью клетки PC3m-LN4 обрабатывались пептидом при концентрации 10 мкг/мл ( $2 \times 10^{-7}$  М) в течение 24 часов. В качестве контроля мы использовали фибробласты мыши (MEF), которые обрабатывали аналогично. Выживаемость кле-

ток анализировалась, как описано в «Методах исследования» [1, 2]. Результаты показали, что пептид ингибировал жизнеспособность опухолевых клеток через 24 часа на ~ 80%, однако, не влиял на рост фибробластов мыши (Рисунок 70) [1, 2].



**Рисунок 70** – Эффект пептида RYQLHPYR на жизнеспособность клеток: **1** – клетки предстательной железы (PC3m-LN4), **2** – клетки PC3m-LN4 + пептид; **3** – фибробласты; **4** – фибробласты + пептид. Различия считали статистически значимыми при \* –  $p \leq 0,05$ .

Это свидетельствует о том, что пептид RYQLHPYR, связываясь с RHAMM рецептором, значительно ингибирует активность митохондриальных дегидрогеназ клетки, которые играют центральную роль в процессах клеточного дыхания и окислительного фосфорилирования, около 40% протонного градиента для синтеза АТФ создаются именно этим комплексом [1, 157].

Таким образом, результаты показали, что RYQLHPYR-пептид при низких концентрациях обладает цитотоксическим действием на клетки РПЖ за счет модуляции RHAMM рецептора.

### **3.8.1. Влияние пептида RYQLHPYR на апоптоз и некроз клеток рака предстательной железы**

На следующем этапе исследования мы изучали влияние пептида RYQLHPYR на апоптоз и некроз клеток PC3m-LN4. Анализ типа гибели клеток проводили методом ELISA, как описано в «Методах исследования» [1]. Мы показали, что клетки, обработанные пептидом (концентрация  $2 \times 10^{-7}$  М), продемонстрировали высокий уровень апоптоза, а именно, пептид увеличивал апоптоз в опухолевых клетках, приблизительно, в 10 раз (Таблица 9) [1].

**Таблица 9** – Эффект пептида RYQLHPYR на апоптоз и некроз клеток PC3m-LN4, фибробластов и фибробластов RHAMM<sup>(-/-)</sup> клеток. Различия являются статистически значимыми при \* –  $p \leq 0,05$ .

Тип клеток	Апоптоз (оптическая плотность при 405 нм, ед.)	Некроз (оптическая плотность при 405 нм, ед.)
PC3m-LN4	0,257	0,114

PC3m-LN4 + пептид	2,213*	0,277*
Фибробласты	0,621	2,324
Фибробласты + пептид	0,656	2,231
Фибробласты RНАММ <sup>(-/-)</sup>	0,423	2,269
Фибробласты RНАММ <sup>(-/-)</sup> + пептид	0,690	1,710

Эти результаты указывают на то, что RYQLHPYR пептид обладает апоптотической активностью, и, вероятно, RНАММ вовлечен в апоптозные пути, которые индуцируют потерю энергии и ингибирование работы мембранных насосов клетки [2, 14, 331].

Затем мы исследовали эффект пептида на некроз клеточной линии PC3m-LN4. Наши результаты показали, что пептид стимулировал некротическую гибель опухолевых клеток, приблизительно, в 2,5 раза (Таблица 9). Эти результаты свидетельствуют о том, что индукция апоптоза под действием пептида сопровождается последующим развитием некроза опухолевых клеток. Следует отметить, что в современной онкологии индукция некроза используется как один из методов лечения злокачественных опухолей.

Для подтверждения специфичности действия пептида RYQLHPYR на опухолевые клетки, мы изучали влияние пептида на апоптоз и некроз нормальных фибробластов и фибробластов RНАММ<sup>(-/-)</sup>. Результаты показали, что пептид не оказывал значительного эффекта на апоптоз и некроз нормальных клеток (Таблица 9). Как видно из Таблицы 9, уровень апоптоза в фибробластах был практически одинаковым до обработки пептидом и после (оптическая плотность 0,621 ед. и 0,656 ед., соответственно). Установлено, что изначально уровень некроза в фибробластах был 2,324 ед., а после добавки пептида он составил 2,231 ед. Статистический анализ данных показал, что наблюдаемые незначительные различия в уровне апоптоза и некроза в контрольных и обработанных пептидом фибробластах не являются статистически значимыми. Это свидетельствует о том, что пептид не влияет на уровень апоптоза и некроза в фибробластах, потому что в фибробластах нет такого высокого уровня экспрессии RНАММ, который наблюдается в опухолевых клетках. Это указывает на то, что пептид действует целенаправленно на опухолевые клетки и его эффект проявляется через сигнальные пути рецептора [1].

Чтобы подтвердить участие RНАММ в индукции апоптоза и некроза, мы исследовали влияние пептида на апоптоз и некроз нокаут фибробластов RНАММ<sup>(-/-)</sup>, в которых отсутствует данный рецептор. Как видно из Таблицы 9, пептид не влиял на уровень апоптоза и некроза в фибробластах RНАММ<sup>(-/-)</sup>. Наблюдаемые незначительные различия в уровне апоптоза и некроза в контрольных фибробластах и обработанных пептидом, не являются статистически значимыми. Эти данные указывают на то, что индукция апоптоза и некроза в опухолевых клетках под действием пептида действительно является RНАММ-опосредованной [1, 2, 16].

Таким образом, результаты показали, что пептид RYQLHPYR селективно влияет на опухолевые клетки, не затрагивая жизнеспособность нормальных клеток, и его действие осуществляется через RНАММ рецептор. Эти результаты согласуются с ранее полученными данными о специфичности действия RНАММ-таргет пептидов на опухолевые клетки молочной железы [14, 16].

### **3.8.2. Влияние пептида RYQLHPYR на активность каспаз-3/7**

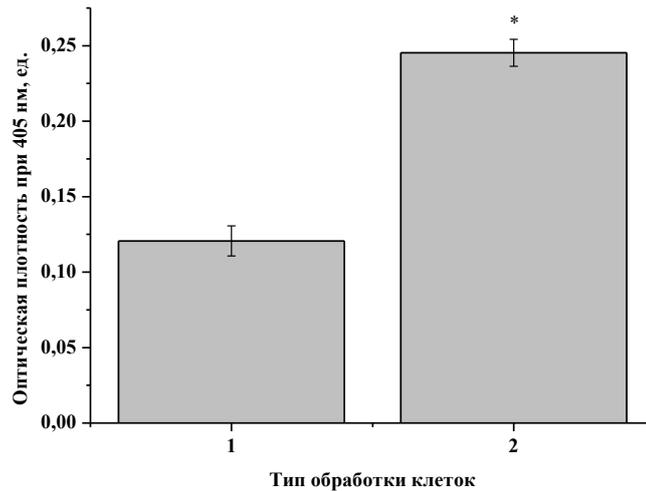
Из литературы известно, что существуют два основных пути апоптоза в клетке: митохондриальный путь и путь через рецепторы апоптоза [1, 331]. Оба пути приводят к активации каспаз и запуску каскада реакций, приводящих к гибели клетки. Митохондрии являются ключевым регулятором каспазного каскада и апоптоза, при этом наблюдается выброс цитохрома С в цитоплазму, активация каспазы 9 и затем каспаз-3/7 [1, 79].

Поскольку мы наблюдали цитостатический эффект и индукцию апоптоза и некроза в опухолевых клетках под действием пептида, мы исследовали влияние данного пептида на митохондриальный тип апоптоза. Активация каспаз-3/7 является основным индикатором митохондриального апоптоза, поэтому мы изучали эффект пептида на активность каспаз-3/7 в РС3m-LN4 клетках. Фибробласты мыши (MEF) использовали в качестве контрольных клеток. К клеткам добавляли пептид ( $2 \times 10^{-7}$  М) и инкубировали в течение 24 часов. Затем активность каспаз-3/7 измеряли, как описано в «Методах исследования» [16]. Результаты показали, что активность каспаз-3/7 увеличилась примерно в 2 раза в РС3m-LN4 клетках, обработанных пептидом, по сравнению с клетками, необработанными пептидом (Рисунок 71) [1, 2, 16]. Пептид не оказывал влияния на активность каспаз-3/7 в фибробластах (данные не показаны). Эти данные подтверждают участие каспаз-3/7 в индукции апоптоза в опухолевых клетках РС3m-LN4, так как пептид значительно повышал активность каспаз-3/7.

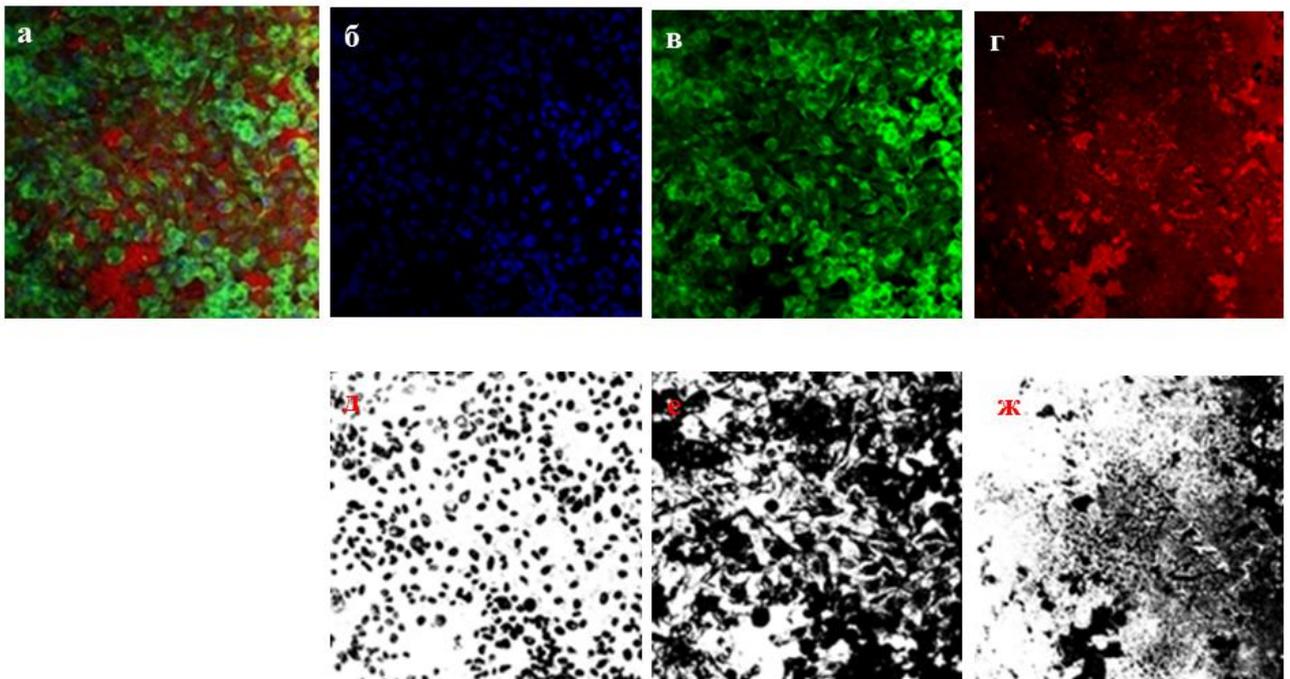
Таким образом, наши результаты показали, что под действием пептида наблюдается активация каспаз-3/7, что свидетельствует об индукции митохондриального пути апоптоза. Следовательно, RНАММ рецептор участвует в передаче сигналов в митохондриальный путь апоптоза [1].

### **3.8.3. Влияние пептида RYQLHPYR на инвазивность клеток РПЖ**

Чтобы анализировать, может ли RYQLHPYR пептид ингибировать инвазивность клеток РПЖ, клетки высевали на Су3-флуоресцеин-желатиновые подложки, затем добавляли пептид или только ростовую среду (DMEM, контроль) и выращивали клетки в течение 40 часов [1]. После фиксации и окраски клеток согласно протоколу, описанному в «Методах исследования», снимали изображения и анализировали площадь деградации желатина клетками методом конфокальной микроскопии. На Рисунке 72 (а–ж) представлены изображения клеток РС3m-LN4 без обработки пептидом [1].



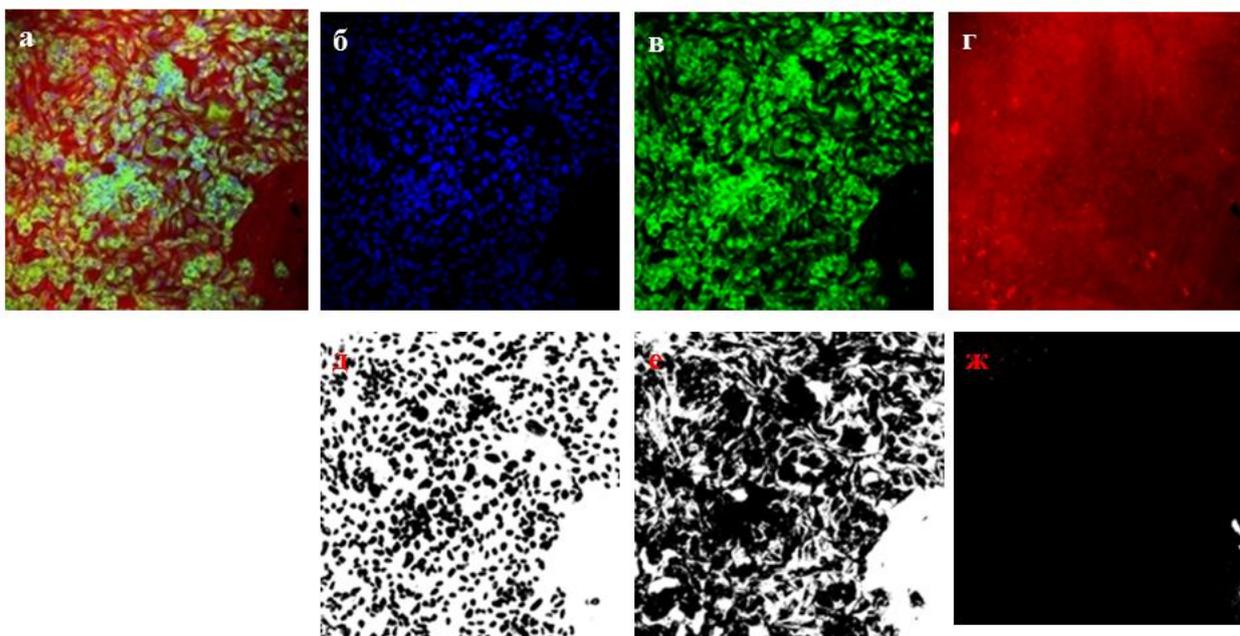
**Рисунок 71** – Влияние пептида RYQLHPYR на активность каспаз-3/7 в опухолевых клетках предстательной железы (PC3m-LN4): 1-PC3m-LN4; 2-PC3m-LN4+пептид. Различия являются статистически значимыми при \* –  $p \leq 0,05$  по отношению к контрольным клеткам без обработки FITC-пептидом.



**Рисунок 72** – Анализ инвазивности клеток PC3M-LN4. Конфокальные изображения клеток (а), ядер (б), актина (в) и деградации желатина (г). Желатин окрашен красителем Cy3 (красная флуоресценция), ядро клеток окрашено DAPI (синяя флуоресценция), актин клеток окрашен красителем FITC-фаллоидином (зеленая флуоресценция). Изображения клеток, полученные с помощью программы ImageJ software: д – число клеток, е – площадь клеток (черный цвет), ж – площадь деградации желатина (белый цвет). Увеличение  $\times 20$ .

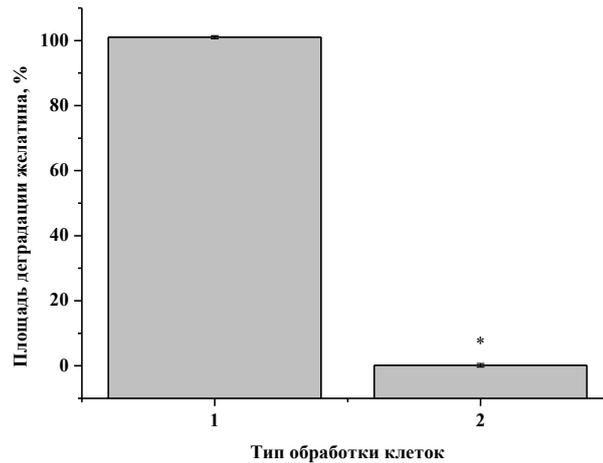
Показано, что инвазивные клетки PC3m-LN4 вызывают лизис желатина, относящийся к образованию инвадоподий в виде областей, в которых отсутствует флуоресценция желатина, на конфокальных изображениях эта область черного цвета (Рисунок 72, а, г) [1]. Инвазивные PC3m-LN4 клетки имеют большое количество инвадоподий и высокую концентрацию актина

на концах клетки (Рисунок 72, а, в). Анализ изображений показал, что клетки РС3m-LN4, необработанные пептидом, значительно деградировали желатин, и площадь его деградации составляла около 90% от общей площади клеток (Рисунок 72, г, ж). Однако клетки, обработанные пептидом, претерпели морфологические изменения, количество инвадоподий уменьшилось, и площадь деградации желатина резко сократилась, что свидетельствует о подавлении инвазивности клеток (Рисунок 73, а, г) [1].



**Рисунок 73** – Эффект пептида RYQLHPYR на инвазивность опухолевых клеток. Конфокальные изображения клеток (**а**), ядер (**б**), актина (**в**) и деградации желатина (**г**): РС3m-LN4 клетки, обработанные пептидом. Желатин окрашен красителем СуЗ (красная флуоресценция), ядро клеток окрашено DAPI (синяя флуоресценция), актин клеток окрашен красителем FITC-фаллоидином (зеленая флуоресценция). Изображения клеток, полученные с помощью программы ImageJ software: **д** – число клеток, **е** – площадь клеток (черный цвет), **ж** – площадь деградации желатина (белый цвет). Увеличение  $\times 20$ .

На Рисунке 72, д–ж и 73, д–ж представлены изображения клеток, полученные с помощью программы ImageJ software, показывающие число клеток (черного цвета), площадь клеток (черного цвета) и площадь деградации желатина (белого цвета). Количественный анализ площади деградации желатина с помощью ImageJ software показал, что клетки, обработанные пептидом, деградировали только 0,14% площади желатина по отношению к общей площади клеток, что свидетельствует об ингибировании инвазивности клеток на 99,86% в сравнении с контролем (Рисунок 74).



**Рисунок 74** – Количественный анализ деградации желатина клетками PC3m-LN4 (1) и клетками, обработанными пептидом RYQLHPYR (2), с помощью ImageJ программы. \*  $p \leq 0,05$  по отношению к контрольным клеткам без обработки пептидом.

Эти результаты показали, что пептид RYQLHPYR значительно ингибировал инвазивность опухолевых клеток РПЖ [1]. Эти данные согласуются с ранее опубликованными результатами, что RНАММ-таргет пептиды ингибировали инвазивность опухолевых клеток молочной и предстательной желез [1, 16, 18, 19, 443]. Следовательно, эти результаты указывают на то, что пептид RYQLHPYR обладает антиметастатическим действием.

Таким образом, наши результаты продемонстрировали, что пептид RYQLHPYR индуцирует апоптоз, некроз и тем самым ингибирует жизнеспособность и инвазивность клеток рака предстательной железы. Полученные результаты свидетельствуют о том, что пептид RYQLHPYR обладает терапевтическим потенциалом для лечения рака простаты [1, 2].

### 3.9. Влияние RНАММ-таргет пептидов на рост опухоли у ксенографтов (мышинная опухолевая модель)

В следующей части работы мы исследовали эффект RНАММ-таргет пептидов на рост опухолей у ксенографтов (иммунодефицитные мыши) [17]. Иммунодефицитные животные традиционно используются для получения моделей различных злокачественных опухолей. Нами была создана такая модель, как описано в «Методах исследования», путем имплантации перевиваемой культуры клеток PC3mLN4 с целью адаптации ее к росту у мышей.

Клетки рака предстательной железы (PC3mLN4) растили до логарифмической фазы, затем получали клеточную суспензию методом трипсинизации до концентрации клеток  $2 \times 10^7$  / мл. К клеткам добавляли пептиды (GEGEEGEE, DFGEEAEE и RYQLHPYR [1], конечная концентрация 40 мкг/мл). К контрольным клеткам (без пептидов) добавляли равное количество ростовой среды [1]. Затем клеточную суспензию (100 мкл, концентрация клеток  $2 \times 10^7$ /мл) вводили в левую подкожную переднюю часть, в подмышечную впадину 5-недельных мышей в асептических

условиях. Рост опухолей анализировали пальпацией и через 1 неделю у всех мышей, инокулированных клетками (PC3mLN4), под мышкой ощущалась небольшая выпуклость. Через 2 недели наблюдалось образование опухолей у всех мышей, и после этого проводились регулярные замеры массы тела мышей и размера опухолей. При этом было замечено, что размер опухолей у мышей в контрольной группе (без обработки раковых клеток пептидами) заметно возрастает, а в экспериментальной группе мышей, инокулированных раковыми клетками, предварительно инкубированных с пептидами, рост опухолей заметно замедляется [14, 17]. С 20-го дня стало заметно, что объем опухолей в группе мышей, обработанных пептидами, был значительно меньше, чем в группе мышей, инокулированных клетками PC3mLN4, необработанными пептидами (контрольные опухоли) [14, 17]. На 35-й день эксперимента животных умерщвляли, опухоли вырезали и взвешивали. В качестве количественного критерия эффективности действия пептидов использовали соотношение массы опухолей в группе животных, обработанных пептидами, и в контрольной группе животных, выраженное в процентах: T/C, % (обработка пептидами/контроль). Минимально значимым соотношением является  $T/C \leq 42\%$ . Это указывает на то, что эффективным считается такая обработка, которое позволяет уменьшить рост опухолей более чем наполовину [17, 79].

Показано, что средний вес опухолей был 0,226 г в контрольной группе и 0,091 г в экспериментальной группе (пептид GEGEEGEE), что указывает на 58% ингибирования роста опухолей пептидом (Таблица 10). Мыши, инокулированные клетками, предварительно инкубированными с пептидом DFGEEAEE, имели вес опухолей равный 0,0825 г, что указывает на 63,5% ингибирования роста опухолей пептидом (Таблица 10) [1, 2, 17]. Вес опухолей в группе мышей, инокулированных клетками после обработки пептидом RYQLHPYR, был значительно меньше, чем в других группах и составил 0,0123 г, что указывает на ингибирование роста опухолей на 94,6%. (Таблица 10). Все эти значения являются статистически значимыми по отношению к мышам, инокулированным раковыми клетками без предварительной инкубации с пептидами (\* $p \leq 0,05$ ).

**Таблица 10** – Ингибирование роста опухолей у мышинных ксенографтов под действием RНАММ-таргет пептидов. Различия являются статистически значимыми при \* –  $p \leq 0,05$  по сравнению с контрольными опухолями (без обработки пептидами).

<i>Препарат</i>	<i>Путь введения</i>	<i>Доза, мг/кг</i>	<i>Вес опухолей, г</i>	<i>Ингибирование роста опухолей, %</i>	<i>T/C, %</i>
Контрольная группа	подкожно	2,5	0,226	0,0	0,0
GEGEEGEE	подкожно	2,5	0,091*	59,8	40,2
DFGEEAEE	подкожно	2,5	0,0825*	63,5	36,5

RYQLHPYR	подкожно	2,5	0,0123*	94,6	5,4
----------	----------	-----	---------	------	-----

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что RНАММ-таргет пептиды обладают противоопухолевой активностью *in vivo*.

## Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В диссертационной работе впервые идентифицированы и синтезированы RНАММ-таргет пептиды, исследовано влияние RНАММ-таргет пептидов на жизнеспособность, апоптоз, некроз и инвазивность опухолевых клеток различных клеточных культур, а именно клеток рака молочной и предстательной железы, клеток рака яичников. В ходе работы были получены новые, приоритетные результаты, углубляющие знания о функции RНАММ рецептора и RНАММ-таргет пептидов в клетке, имеющие значение для биохимии и онкологии [15]. Впервые показано, что модуляция функции RНАММ рецептора с помощью RНАММ-таргет пептидов влияет на процессы выживаемости, апоптоз, некроз и инвазивность раковых клеток. Впервые показано, что RНАММ-таргет пептиды являются тераностиками и могут использоваться для диагностики и терапии онкологических заболеваний. Более подробное обсуждение результатов, полученных при выполнении диссертационной работы, представлено в приведенных ниже главах.

### 4.1. Идентификация, дизайн и синтез RНАММ-таргет пептидов

В настоящее время установлено, что RНАММ является онкорепцептором, который сверхэкспрессируется при различных раковых заболеваниях человека (рак молочной, предстательной железы, рак яичников, желудка, прямой кишки и других), и эта чрезмерная экспрессия связана с плохим клиническим исходом [9, 15, 38, 362, 443, 526, 536, 537]. Повышенное накопление ГК, этого внеклеточного лиганда для RНАММ, также является плохим прогностическим фактором при раке молочной железы, раке яичников, раке предстательной железы и некоторых других формах рака [19, 38, 168, 362, 443, 536, 537, 543, 564]. Следовательно, пептиды-лиганды, которые имитируют ГК и конкурируют с ГК за связывание с RНАММ, могут быть полезны как для диагностических, так и для терапевтических целей при онкологических заболеваниях.

В этом исследовании мы идентифицировали и синтезировали пептиды, специфично взаимодействующие с ГК-связывающим доменом RНАММ [163]. Мы предположили, что связывание пептидов может происходить из-за того, что области связывания ГК и тубулина микротрубочек на карбоксильном конце RНАММ перекрываются, а также потому, что связывание ГК и тубулина с RНАММ в значительной степени основано на ионных взаимодействиях [35, 106, 241, 361, 479, 490, 593, 611]. Поэтому мы предположили, что отрицательно заряженные СТТ аминокислотные последовательности тубулина будут связываться с ГК-связывающим доменом RНАММ и конкурировать с ГК за этот центр связывания. Следует отметить, что недавние исследования показали, что белки клеточной поверхности могут связываться с белками цитоскелета в поврежденных или апоптозных клетках [16], и это взаимодействие является специфичным, имеет высокое сродство и важно для обнаружения поврежденных клеток [18, 426, 633].

Таким образом, идентификация пептидов-лигандов, которые связываются с поверхностным RНАММ, имеет важное физиологическое значение и может стать основой для разработки не только нового терапевтического подхода, но также понять новые внутренние и внешние функции как RНАММ, так и ГК.

Чтобы идентифицировать последовательности тубулина, которые связываются с RНАММ, мы использовали поиск в базе данных и проводили попарные сравнения между RНАММ и белками, которые связываются с СТТ последовательностями тубулина (например, MAP, кинезины) [106, 163, 533, 562]. Таким образом, теоретически было установлено специфичное взаимодействие между RНАММ и новыми пептидами-лигандами, являющимися аналогами СТТ последовательности тубулина [18, 163]. На основании полученных данных были синтезированы пептиды высокой степени чистоты. Далее мы исследовали специфичность связывания этих пептидов с RНАММ с помощью различных физико-химических, биохимических методов, методом конкурентного замещения лигандов на рецепторе, а также методами клеточного анализа и молекулярной биологии [63, 106, 163, 443]. Ранее нами были разработаны методики и подходы для изучения связывания лигандов с рецепторами *in vitro*, используя рекомбинантные белки и клеточные модели [63]. Нами были отработаны методы идентификации молекулярных мишеней в клетке, подходы для модуляции активности рецепторов различными лигандами, метод конкурентного замещения лигандов на центрах связывания с рецепторами (бензодиазипиновый рецептор), и затем эти методы использовались в диссертационной работе [63].

Результаты нашего исследования показали, что полученные пептиды способны связываться с рекомбинантным RНАММ-СТ, конкурировать с ГК за центр связывания на RНАММ рецепторе [16]. Дальнейший анализ показал, что пептиды (VEGEGEEEEGEEY, EEDFGEEAEAAA и FTEAESNMNDLV) обладали наиболее высоким сродством к RНАММ и имели высокие константы связывания, равные 24–32 нмоль [163].

В нашем исследовании мы впервые продемонстрировали, что эти пептиды специфично связывались с клетками рака молочной, предстательной желез и рака яичников RНАММ-зависимым образом [1, 15, 16, 18, 19, 163, 367, 443]. Мы показали, что клетки, не содержащие RНАММ (фибробласты RНАММ<sup>(-/-)</sup>), были неспособны связывать пептиды [16]. В то же время фибробласты RНАММ<sup>(+/+)</sup> связывали пептиды с высокой эффективностью [1, 15, 19]. Поскольку ранее было показано, что ГК также связывается с CD44 рецептором [518], мы исследовали связывание пептидов с этим рецептором. Используя CD44-антитела, мы показали, что пептиды также связываются с CD44 рецептором, но это связывание было намного слабее, чем связывание пептидов с RНАММ рецептором [163]. Вероятно, это объясняется тем, что ГК взаимодействует с RНАММ в основном ионным способом в отличие от взаимодействий ГК с CD44, которые включают дисульфидные, гидрофобные и водородные связи [251, 597].

В нашем исследовании мы впервые показали, что RНАММ-таргет пептиды являются стабильными в бычьей сыворотке крови достаточно продолжительное время (период полувыведения составляет примерно 2–4 часа). Эти результаты предполагают, что RНАММ-таргет пептиды можно использовать для визуализации раковых клеток *in vivo*, а также в качестве потенциальных противоопухолевых препаратов.

Мы впервые показали, что RНАММ-таргет пептиды, идентифицированные в настоящем исследовании, содержат ключевой гексапептидный мотив, отвечающий за взаимодействие с RНАММ [163]. Этот мотив EEXEEZ (где X представляет собой A или G, а Z представляет собой Y или E) присутствует в синтетических пептидах  $\alpha$ 1a (VEGEGEEEGEEY, DSADGEDEGEY),  $\alpha$ 1Ic (SVEAEAEEGEEY),  $\beta$ 1a (EEDFGEEAEAAA) и  $\beta$ IV-СТТ (GEFEEEAEEVA) [1]. Наши результаты согласуются с предыдущими сообщениями [1] о том, что короткая последовательность EEGEE может участвовать в связывании тубулина и MAP, семейства белков, которые имеют гомологию последовательностей с RНАММ [139, 371, 408]. Несмотря на роль кислых функциональных групп во взаимодействии ГК и RНАММ, результаты также предполагают, что случайное появление или увеличение этих кислых остатков в области СТТ, по-видимому, не влияет напрямую на взаимодействие RНАММ-тубулин. Удивительно, что пептиды, содержащие мотивы DEXEEZ (как видно из пептидов DSADGEDEGEY и IDSYEDEDEGEE) и EEXEDZ (например, пептид GEFEEEGEDEA), не прошли первоначальный скрининг, что позволяет предположить, что остатки Asp (D) в этих последовательностях не могут заменять аналогичный кислый остаток Glu в этом мотиве. Это предполагает, что взаимодействие области СТТ с RНАММ осуществляется за счет не только ионных, но и гидрофобных и водородных связей.

Таким образом, в этом исследовании мы идентифицировали и синтезировали новые пептиды-лиганды, которые взаимодействуют специфично с RНАММ. На основании этого мы ввели новый термин RНАММ-таргет пептиды [1]. Следовательно, эти RНАММ-таргет пептиды могут служить антагонистами, которые могут блокировать взаимодействие ГК/RНАММ [1], тем самым модулировать функции RНАММ. На основании этого, далее мы изучили потенциал RНАММ-таргет пептидов для диагностики и терапии онкологических заболеваний [1].

#### **4.2. Влияние RНАММ-таргет пептидов на выживаемость и пролиферацию опухолевых клеток**

Мы впервые исследовали влияние RНАММ-таргет пептидов (EEDFGEEAEAAA, VEGEGEEEGEEY, FTEAESNMNDLV и RYQLHPYR) на выживаемость и пролиферацию опухолевых клеток молочной (MDA-MB-231) [1] и предстательной желез (PC3m-LN4), для которых характерна повышенная экспрессия RНАММ рецептора. Мы впервые установили, что низ-

кие концентрации RНАММ-таргет пептидов значительно подавляли жизнеспособность опухолевых клеток молочной и предстательной желез (от 50 до 90%) [1, 2, 14, 20]. Анализ жизнеспособности клеток мы проводили с помощью резазурина, который измеряет активность митохондриальных дегидрогеназ в клетке. Поэтому мы показали, что пептиды, связываясь с RНАММ рецептором, значительно ингибировали [1] активность митохондриальных дегидрогеназ [1], которые играют центральную роль в процессах клеточного дыхания и окислительного фосфорилирования, так как основное количество АТФ создается именно этим комплексом [1, 42].

Мы впервые показали, что RНАММ-таргет пептиды ингибировали пролиферацию клеток РМЖ и РПЖ на 50 и 90%, соответственно [20].

Следует отметить, что опухолевые клетки предстательной железы оказались более чувствительными к воздействию пептидов, чем клетки рака молочной железы. Вероятно, это объясняется различными биохимическими свойствами этих клеточных линий [1]. Мы показали, что действие RНАММ-таргет пептидов является специфичным, так как они понижали жизнеспособность, пролиферацию опухолевых клеток [2], однако, не влияли на рост нормальных клеток, а именно, фибробластов мыши [1]. Это свидетельствует о том, что RНАММ-таргет пептиды действуют целенаправленно на опухолевые клетки, сверхэкспрессирующие RНАММ [1].

Таким образом, результаты показали, что RНАММ-таргет пептиды способны модулировать активность RНАММ рецептора и обладают терапевтическим потенциалом для лечения онкологических заболеваний.

#### **4.3. Влияние RНАММ-таргет пептидов на апоптоз и некроз опухолевых клеток**

Из литературы известно, что существуют два основных пути апоптоза в клетке: митохондриальный путь и внешний сигнальный путь через рецепторы апоптоза [1, 191, 292]. Оба пути приводят к активации каспаз и запуску каскада реакций, приводящих к гибели клетки. Внешний сигнальный путь осуществляется через поверхностные рецепторы-смерти клетки, специально предназначенные для включения программы апоптоза [1, 191, 292]. Такими рецепторами смерти являются рецепторы Fas, TNFR1, DR3, DR4, DR5 [1, 119, 191, 292, 493, 591]. Внешний сигнальный путь апоптоза индуцируется физиологическими факторами-индукторами апоптоза, такими как гормоны, ростовые факторы, цитокины и другие соединения [1, 2, 374, 424]. Посредством рецепторов смерти могут быть активированы три иницирующие каспазы: 2, 8 и 10 [1, 2, 524]. В отличие от внешнего сигнального пути апоптоза, митохондриальный путь активации апоптоза [2] индуцируется действием цитотоксических агентов, радиации, повреждением ДНК, глюкокортикоидов, апоптотических белков Bcl-2, Вах и Вак [1, 292]. Эти белки вызывают пермеабиллизацию митохондриальной мембраны, высвобождение цитохрома С, белка АИФ в цитоплазму, активи-

вазию каспаз 2, 3, 7 и 9, истощение митохондриального пула АТФ, что и приводит к апоптозу [1, 25, 316, 417, 418, 434].

На первом этапе исследования, нами было показано, что RНАММ-таргет пептиды ингибировали активность митохондриальных дегидрогеназ и, тем самым, подавляли жизнеспособность опухолевых клеток. Далее мы исследовали, какой тип гибели наблюдается в раковых клетках [1, 2]. Мы впервые показали, что RНАММ-таргет пептиды значительно индуцировали апоптоз в опухолевых клетках молочной и предстательной желез (в 2–5 раз) [1, 2, 14]. Наибольший эффект оказывал пептид RYQLHPYR, который увеличивал апоптоз в клетках рака предстательной железы в 10 раз [1, 2]. Активация каспаз-3/7 является основным индикатором митохондриального апоптоза, поэтому мы изучали эффект RНАММ-таргет пептидов на активность каспаз-3/7 в опухолевых клетках молочной и предстательной желез. Мы впервые показали, что активность каспаз-3/7 значительно увеличилась под действием пептидов в клеточных культурах MDA-MB-231 и PC3m-LN4 [2]. При этом пептиды не оказывали влияния на активность каспаз-3/7 в фибробластах [2, 14]. Эти результаты продемонстрировали, что RНАММ-таргет пептиды и RНАММ вовлечены в митохондриальный путь активации апоптоза, который индуцирует потерю энергии и ингибирование работы мембранных насосов клетки [1, 2, 171, 294, 567].

Поскольку апоптоз клеток обычно сопровождается некрозом, мы исследовали также влияние RНАММ-таргет пептидов на некроз клеток рака молочной и предстательной желез. Мы впервые показали, что пептиды (VEGEGEEEGEEY и FTEAESNMNDLV) значительно увеличивали (примерно, в 4 раза) некротическую гибель раковых клеток молочной железы [14]. Однако эффект RНАММ-таргет пептидов на раковые клетки предстательной железы был противоположным. Наши результаты показали, что пептиды (EEDFGEEAEAAA, VEGEGEEEGEEY) значительно ингибировали некротическую гибель PC3m-LN4 клеток (примерно, в 4 раза) [1, 2]. Следует отметить, что поведение этих пептидов сходно с PARP-ингибиторами, которые стимулируют апоптоз клеток, и в то же время ингибируют некроз опухолевых клеток, через ингибирование фермента PARP (поли-АДФ-рибозо-полимеразы) [2, 522]. Однако пептид RYQLHPYR стимулировал некроз клеток рака предстательной железы, приблизительно, в 2,5 раза [1, 15]. Такие различия в действии пептидов, очевидно, связаны с различной структурой пептидов, а также с различиями в метаболизме клеточных культур.

Что касается литературных данных об использовании некроза для лечения рака, то они являются противоречивыми [15]. С одной стороны, имеются исследования, показывающие, что индукция некроза используется как один из современных методов лечения злокачественных опухолей [1, 15, 270, 360]. С другой стороны, ингибирование некроза является хемотоксической стратегией при лечении онкологических заболеваний [15, 400].

Для подтверждения адресного действия RHAMM-таргет пептидов на опухолевые клетки, мы изучали также влияние пептидов на апоптоз и некроз нормальных клеток (фибробластов) [2, 15]. Результаты показали, что RHAMM-таргет пептиды не оказывали значительного эффекта на апоптоз и некроз нормальных клеток. Уровень апоптоза и некроза в фибробластах был практически одинаковым до обработки пептидами и после [1, 2, 14, 15]. Это свидетельствует о том, что пептиды не влияли на уровень апоптоза и некроза в фибробластах, потому что в фибробластах нет такого высокого уровня экспрессии RHAMM, который наблюдается в опухолевых клетках [2/15]. Это указывает на то, что в раковых клетках пептиды специфично связываются с RHAMM рецептором и, таким образом, индуцируют апоптоз и некроз через сигнальные пути рецептора [2, 15].

Чтобы подтвердить участие RHAMM рецептора в апоптозе и некрозе, мы исследовали влияние RHAMM-таргет пептидов на апоптоз и некроз фибробластов RHAMM<sup>(-/-)</sup>, в которых отсутствует данный рецептор. Мы показали, что пептиды не влияли на уровень апоптоза и некроза в фибробластах RHAMM<sup>(-/-)</sup> [1, 2, 14, 15]. Эти данные указывают на то, что индукция апоптоза и некроза в опухолевых клетках под действием пептидов является RHAMM-опосредованной.

Таким образом, мы впервые показали, что RHAMM-таргет пептиды селективно влияли на опухолевые клетки, не затрагивая жизнеспособность нормальных клеток, и их действие осуществлялось за счет модуляции RHAMM рецептора. В целом эти результаты продемонстрировали, что RHAMM-таргет пептиды имеют противоопухолевый потенциал для лечения онкологических заболеваний [1, 15].

#### **4. 4. Влияние RHAMM-таргет пептидов на инвазивность опухолевых клеток**

В настоящее время установлено, что основной причиной возникновения метастазов является инвазивность раковых клеток через слои внеклеточного матрикса [15, 141]. Внеклеточный матрикс [15] представляет собой сложную структуру, которая окружает и поддерживает клетки в тканях. В состав внеклеточного матрикса входят различные белки, в частности, коллаген, гликопротеины, протеогликаны, фибриноген, ламинин, гиалуроновая кислота и протеолитические ферменты [15, 18, 403]. Во время прогрессии рака, существенные изменения можно наблюдать в структурных и механических свойствах компонентов матрикса. Внеклеточный матрикс необходим для ключевых клеточных процессов, таких как подвижность клеток, адгезия, пролиферация, инвазивность и метастазирование [15, 16, 18, 20, 386]. Внеклеточный матрикс обеспечивает физический плацдарм, к которому опухолевые клетки присоединяются и мигрируют [15]. Стадии инвазивности включают прикрепление клетки к матриксу (адгезию), расщепление проксимальных молекул матрикса, миграцию клетки в новое пространство матрикса и продвижение

клетки через образуемое отверстие в матриксе [15, 16, 18, 173, 186]. Каждая из этих стадий осуществляется с помощью набора различных белков, включая протеазы, интегрины, GTP-азы, киназы, рецепторы (CD44, RHAMM) и цитоскелетон-взаимодействующие белки. Ключевым признаком клетки, отвечающим за деградацию матрикса, является образование инвадоподий или подосом с протеолитической активностью [15, 18, 136, 290]. Многие белковые молекулы участвуют в образовании инвадоподий. Несколько ключевых молекулярных событий включают Src-опосредованное фосфорилирование “scaffolding” белка Tks54, активацию N-WASP белка [15] и регуляцию кортактина с помощью Arp2/3 комплекса, индукцию полимеризации актина [15, 16, 18, 474, 582, 607], генерацию реактивных форм кислорода под действием фермента НАДН-дегидрогеназы [15, 16, 18, 142], повышенную экспрессию металлопротеиназы, локализацию кортактина в инвадоподиях [15, 113].

В ряде работ показано, что ГК и RHAMM рецептор играют важную роль в процессах инвазивности опухолевых клеток и образовании метастазов при различных онкологических заболеваниях [15, 16, 193, 290, 536, 607]. Обнаружено, что RHAMM изоформа В способствует росту опухоли и образованию метастазов в лимфатических узлах и печени [15, 619]. Установлено, что RHAMM участвует в процессах патогенеза рака головы и шеи, а также сверхэкспрессия этого белка может увеличивать инвазивность раковых клеток, метастазирование рака эндометрия и рака желудка [15, 266, 296, 481, 575]. Известно, что RHAMM является важным прогностическим индикатором развития опухоли и сосудистой инвазии у больных с раком толстой кишки [15, 67]. Показано, что RHAMM рецептор требуется для передвижения гистрансформированных клеток саркомы, цитокин стимулированных фибробластов и Т-лимфоцитов, злокачественных В-клеток и клеток карциномы молочной железы [15, 346, 266, 481, 575]. Взаимодействие между ГК и RHAMM способствует подвижности клеток через путь сигнальной трансдукции фермента тирозинкиназы, которая регулирует координационную адгезию [15, 16, 18, 533, 575]. Тирозинкиназа p60c-SRC взаимодействует с RHAMM в клетках и является необходимой для RHAMM опосредованной клеточной подвижности. Известно, что взаимодействие между ГК и RHAMM, приводит к повышенному фосфорилированию тирозина в RHAMM, что является важным механизмом для инициации локомоции и регуляции миграции опухолевых клеток [15, 16, 71, 79, 533]. Вполне возможно, что RHAMM/SRC путь индуцирует фокальную адгезию, чтобы сигнализировать изменения цитоскелетона, необходимые для повышенной подвижности клеток, наблюдаемой при инвазивности и метастазировании опухоли [15, 317]. Следует отметить, что повышенный синтез низкомолекулярной ГК также является диагностическим маркером прогрессирования и метастазирования многих злокачественных опухолей и коррелирует с плохим прогнозом [71, 229, 268, 483]. Именно низкомолекулярная ГК модулирует активность RHAMM во время прогрессирования опухоли, содействует нарушению

эндотелиальных межклеточных контактов и, таким образом, способствует инвазивности раковых клеток и образованию метастазов [16, 18, 123, 201, 352, 480, 488, 548]. На основании вышесказанного ГК и RНАММ рассматриваются как потенциальные мишени для терапии рака [16].

Многочисленные исследования проводились, чтобы разработать таргетные подходы, целенаправленно действующие на ГК и RНАММ, включая создание низкомолекулярных ингибиторов, антител и вакцин [15, 207, 267, 608, 612]. Данные разработки были направлены на ингибирование внутриклеточной передачи сигнала от ГК к RНАММ, чтобы повлиять на подвижность и инвазивность опухолевых клеток. Однако они имели ряд недостатков, например, использование антител является дорогостоящим, а низкомолекулярные ингибиторы были неспецифичными [267, 612].

В данном исследовании мы использовали новый подход для модуляции активности RНАММ рецептора с помощью пептидов-антагонистов, чтобы ослабить или блокировать сигналы, запускаемые ГК, и тем самым влиять на инвазивность опухолевых клеток. Наш подход включает использование RНАММ-таргет пептидов, которые способны конкурировать с ГК и специфично связываться с RНАММ. В данном исследовании мы изучали действие RНАММ-таргет пептидов на инвазивность клеток РМЖ и РПЖ.

#### ***4.4.1. Ингибирование инвазивности опухолевых клеток молочной железы под действием RНАММ-таргет пептидов***

На первом этапе исследования мы изучали развитие инвазивности раковых клеток (MDA-MB-231), культивируемых на желатиновых подложках, в течение времени методом конфокальной микроскопии [16, 18]. Результаты исследования показали, что вначале раковые клетки практически не были инвазивными, однако, через 24 час клетки начинали деградировать желатин, то есть их инвазивность возрастала и достигала значительной величины через 40 часов культивирования. Площадь деградации желатина при этом увеличивалась от ~8% до ~90% в интервале между 24 и 40 часами [16]. Следует отметить, что наблюдаемое повышение инвазивности клеток сопровождалось образованием [16] большого количества инвадоподий и высокой концентрацией актина на концах клеток. При этом сравнительный анализ инвазивности опухолевых клеток и фибробластов (нормальных клеток) показал [16], что фибробласты не деградировали желатин, что указывало на отсутствие инвазивности в нормальных клетках [15].

Таким образом, мы установили, что инвазивность клеток РМЖ возрастала во времени [16], тогда как нормальные клетки, фибробласты не обладали инвазивностью.

Затем мы анализировали эффект RНАММ-таргет пептидов на инвазивность опухолевых клеток. Мы впервые показали, что обработка раковых клеток (MDA-MB-231) пептидами (EEDFGEEAEEEE и VEGEGEEEGEEY) подавляла инвазивность опухолевых клеток на ~ 70–

80% [16]. В то же время клетки, необработанные пептидами, продолжали демонстрировать высокий уровень деградации желатина (~ 90%) [16]. Эти результаты показали, что RНАММ-таргет пептиды ингибировали образование инвадоподий и, соответственно, инвазивность клеток РМЖ.

Таким образом, мы показали, что RНАММ-таргет пептиды обладают анти-метастатическим потенциалом *in vitro*.

#### **4.4.2. Анализ гетерогенности популяции MDA-MB-231 клеток в процессе инвазивности**

Известно, что в ходе развития рака популяция опухолевых клеток обычно становится неоднородной, потому что рак является динамическим заболеванием. В результате этой гетерогенности опухоль может включать разнообразный набор клеток, несущих различные молекулярные «сигнатуры» с разными уровнями чувствительности к лечению. Эта гетерогенность может привести к неравномерному распределению генетически различных субпопуляций опухолевых клеток по участкам заболевания (пространственная неоднородность) или к временным вариациям молекулярного состава раковых клеток (временная гетерогенность) [16, 18]. Подобная гетерогенность опухолевых клеток объясняет прогрессирование опухоли, процессы рецидива и предполагает новые подходы для терапии [109, 124, 348, 447, 586]. Поэтому изучение неоднородности опухолевых клеток является важным для разработки новых эффективных индивидуализированных методов лечения. Мультирегиональное секвенирование, секвенирование отдельных клеток, анализ образцов аутопсии и продольный анализ образцов жидкой биопсии – все это новые технологии, обладающие значительным потенциалом для анализа сложной клональной архитектуры рака.

Однако анализ гетерогенности опухолевых клеток в процессе развития инвазивности в литературе отсутствует. Поэтому мы исследовали гетерогенность популяции раковых клеток при развитии инвазивности методом конфокальной микроскопии [16]. Результаты сравнительного анализа популяции опухолевых клеток (MDA-MB-231) в процессе их роста показали визуально гетерогенность популяции [16]. Мы впервые обнаружили, что вначале раковые клетки незначительно деградировали желатин, то есть их инвазивность была низкая [16]. При этом популяция клеток выглядела однородной, клетки были одинакового размера и формы, визуально не наблюдалось морфологических изменений [16]. Однако, по мере деления клеток, через 40 часов мы наблюдали изменения в локализации и структуре актина в клетках, актин концентрировался на концах инвадоподий, и при этом возрастала деградация желатина, то есть инвазивность клеток увеличивалась [16]. Следует отметить, что популяция клеток при этом становилась неоднородной [16]. Наряду с клетками мелкого размера, мы наблюдали гигантские клетки

(senescence cells, клетки старения), которые превосходили во много раз обычные по размеру клетки, отличались эти клетки наличием большого количества ядер (до 6 в клетке) и отсутствием инвадоподий [16]. Из литературы известно, что появление многоядерных клеток связано с нарушением экспрессии мембранного белка супервиллина [16, 495]. Известно, что данный белок взаимодействует с RНАММ-рецептором и тем самым координирует действие актина и двигательные функции микротрубочек митотического веретена во время клеточного цикла [16] и, таким образом, влияет на миграцию клеток, ERK-сигнальные пути, цитокинез и инвазивность клеток [16, 495].

Мы впервые показали, что появление гигантских клеток старения совпадало с началом интенсивной инвазивности, что приводило к гетерогенности популяции опухолевых клеток [16, 18]. Однако следует отметить, что эти клетки старения не были инвазивными, они не имели филаментов, их актиновые волокна внутри клетки образовывали упорядоченную структуру [16]. Инвазивными были мелкие клетки, которые окружали гигантские клетки и были связаны с ними своими филаментами [16]. Следует подчеркнуть, что эти мелкие клетки обладали длинными инвадоподиями [16] с высокой концентрацией актина на концах, и они интенсивно деградировали желатин [16, 18]. Появление и роль гигантских клеток в популяции пока остается непонятной [16]. Можно предположить, что гигантские клетки, возможно, стимулировали подвижность этих мелких клеток и, и тем самым, повышали их инвазивность [16]. Однако необходимы дальнейшие исследования для понимания их роли в популяции и в процессе инвазивности [16].

#### ***4.4.3. Морфологические изменения актина в клетках РМЖ при обработке RНАММ-таргет пептидами***

Мы впервые показали, что RНАММ-таргет пептиды вызывают значительные изменения в структурной организации актина в опухолевых клетках [16, 18]. Следует обратить внимание, что после обработки клеток с RНАММ-таргет пептидами популяция клеток остается гетерогенной, в ней присутствуют также два типа клеток, гигантские (клетки старения, senescence cells) и мелкие клетки [16]. Однако обработка клеток старения пептидами приводит к полной дезорганизации структуры актина в этих клетках [16]. Мы наблюдали в клетках старения хаотичное, дезорганизованное [16] расположение актиновых фибрилл в цитоплазме, стресс актиновых волокон, нарушение целостности цитоплазматической мембраны клеток [16]. Количественный анализ числа клеток старения на область изображения [15] показал, что обработка клеток RНАММ-таргет пептидами приводила к уменьшению количества гигантских клеток (приблизительно в 3-4 раза) по сравнению с популяцией клеток, необработанных пептидами [15, 16, 18]. На основании этого можно предположить, что гигантские клетки старения вовлечены в процесс развития инвазивности [15], а RНАММ-таргет пептиды препятствуют их появлению [16]. Воз-

можно, что связывание RНАММ-таргет пептидов с RНАММ рецептором нарушает его взаимодействие с мембранным белком супервиллином, что и приводит к уменьшению количество клеток старения, дезорганизации актина, уменьшению числа инвадоподий и тем самым к снижению инвазивности клеток [15, 16, 495]. Поскольку RНАММ-таргет пептиды уменьшают количество клеток старения, это указывает на то, что пептиды обладают сенолитическим (анти-возрастным) потенциалом [15, 16].

Следует отметить, что инкубация мелких клеток [15] с RНАММ-таргет пептидами также приводит к различным морфологическим изменениям актина. Мы впервые показали, что обработка [15] таких клеток пептидами уменьшала количество инвадоподий в клетках [16], пучки актиновых филаментов становились более тонкими и короткими, наблюдалась диффузная локализация актина в цитоплазме клетки. В целом это приводило к тому, что инвазивность клеток, обработанных пептидами, значительно снижалась по сравнению с контрольными клетками [15, 16]. Ранее было показано, что динамические изменения актина регулируют многие клеточные функции, включая экспрессию генов, поддержание морфологической формы и полярности клеток, деление, миграцию, инвазивность клеток и образование метастазов [15, 16, 145, 276, 455]. Эти функции актина обусловлены его взаимодействием с RНАММ рецептором и ко-локализацией с кортактином [15, 16, 164, 177, 406, 579]. На основании этого, мы предполагаем, что RНАММ-таргет пептиды, связываясь с RНАММ рецептором, блокируют его взаимодействие с актином. Это вызывает структурную дезорганизацию актина, нарушает самоорганизацию актиновых филаментов, индуцирует морфологические изменения в клетке и, тем самым, подавляет формирование инвадоподий [15, 16].

Таким образом, результаты данного исследования указывают на то, что блокирование RНАММ рецептора с помощью RНАММ-таргет пептидов приводит к ингибированию инвазивности [15] клеток РМЖ. В целом, это свидетельствует о том, что RНАММ-таргет пептиды проявляют антиметастатический эффект [15].

#### ***4.4.4. Влияние RНАММ-таргет пептидов на инвазивность клеток РПЖ***

РПЖ развивается из тканей желез простаты и, как все злокачественные опухоли, имеет тенденцию к метастазированию [15, 199, 242, 262]. РПЖ может давать ранние метастазы, то есть даже опухоль небольших размеров может начать распространяться в другие органы [15]. Чаще всего образование метастазов рака простаты наблюдается [15] в лимфатических узлах, костях (таз, бедра, позвоночник) и внутренних органах (легкие, печень, надпочечники) [15, 475]. Базальная мембрана вокруг предстательной железы служит барьером для раковых клеток [15]. Однако появление метастазов обусловлено тем, что опухолевые клетки сначала [15] образуют выпячивания, инвадоподии, которыми прикрепляются к базальной мембране предстатель-

ной железы [15], затем протеазы инвадоподий расщепляют белки внеклеточного матрикса, создают отверстия в базальной мембране, через которые раковые клетки разносятся по всему организму [15, 160, 559]. В настоящее время, несмотря на определенный прогресс в области лечения РПЖ с помощью хирургии, радиационной и химио-терапии, основными проблемами в онкологии остаются отсутствие специфичности противоопухолевых препаратов и образование метастазов [13, 15]. Таргетная, целенаправленная химиотерапия является мощным средством для решения таких проблем [53, 264]. Применение селективных пептидов, которые связываются с известным рецептором, имеет большие перспективы, потому что их основной механизм действия направлен на конкретную молекулярную мишень раковых клеток [15], модуляцию ее активности, приводящей к подавлению инвазивности клетки.

Мы предположили, что пептиды, специфично взаимодействующие с RНАММ, могут модулировать его активность и влиять на процессы инвазивности и метастазирования раковых клеток [15]. В качестве объекта исследования были выбраны агрессивные, инвазивные клетки рака предстательной железы (линия PC3m-LN4), которые характеризуются высокой экспрессией RНАММ, и обычно эта сверхэкспрессия связана с плохим прогностическим фактором [1, 15]. В данном исследовании мы впервые синтезировали пептиды (GEGEEGEE, DFGEEAEE и RYQLHPYR), показали специфичность их взаимодействия с RНАММ на поверхности клеток рака предстательной железы [1, 15, 19]. Для сравнения мы анализировали связывание пептидов также с CD44 или FcR рецепторами, и наши результаты показали отсутствие связывания пептидов с этими рецепторами [15]. Основываясь на специфичности связывания пептидов с RНАММ рецептором, который участвует в процессах инвазивности опухолевых [15] клеток, далее мы исследовали эффект этих пептидов на образование инвадоподий в клетках.

Мы впервые показали, что предварительная инкубация агрессивных раковых клеток с пептидами приводила к значительному ингибированию инвазивности (80–90%) клеток рака предстательной железы [1, 15]. Эти результаты согласуются с данными об участии RНАММ рецептора в процессах инвазивности раковых клеток и свидетельствуют о том, что пептиды блокируют активность RНАММ рецептора и, таким образом, ингибируют образование инвадоподий в опухолевых клетках РПЖ. Результаты нашего исследования показали, что RНАММ-таргет пептиды являются перспективными кандидатами для разработки противоопухолевых препаратов [15]. В следующей части работы мы изучали влияние RНАММ-таргет пептидов на процессы метастазирования *in vivo*.

#### **4.5. Противоопухолевая активность RНАММ-таргет пептидов на моделях ксенографтов (мышинная опухолевая модель)**

Мы впервые показали, что предварительная инкубация клеток рака простаты (PC3m-LN4) с RНАММ-таргет пептидами (GEGEEGEE, DFGEEAEE и RYQLHPYR) приводила к замедлению роста опухолей в экспериментальной группе по сравнению с контрольной группой [17]. Результаты нашего исследования продемонстрировали, что RНАММ-таргет пептиды ингибировали рост опухолей от 58 до 94%. В частности, пептид GEGEEGEE вызывал 58%-ное ингибирование, а пептид DFGEEAEE ингибировал рост опухолей на 63,5%. Наибольшей противоопухолевой активностью обладал пептид RYQLHPYR, который ингибировал рост опухолей на 94,6% [17]. Вероятно, такие различия в степени ингибирования роста опухолей связаны со структурой пептидов. Ранее мы показали, что RНАММ-таргет пептиды, индуцируют апоптоз, некроз раковых клеток и блокируют инвазивность опухолевых клеток *in vitro* [2, 14-16, 18, 20, 163, 443].

В данном исследовании мы впервые показали, что RНАММ-таргет пептиды проявляют противоопухолевую активность *in vivo*. Эти результаты могут послужить основой для применения RНАММ-таргет пептидов с целью лечения онкологических заболеваний.

#### **4.6. Визуализация клеток рака яичников пептидом VEGEGEEEGEEY**

Рак яичников находится на шестом месте по распространению и является наиболее часто диагностируемым видом рака у женщин, второй наиболее распространенной гинекологической злокачественной опухолью у женщин, и самой фатальной опухолью женской репродуктивной системы [89]. Заболевание протекает в скрытой форме, демонстрируя неопределенные симптомы, и проявляется уже на поздних стадиях, когда опухоль достигает больших размеров. В настоящее время эффективные методы выявления рака яичников на ранних стадиях отсутствуют. В 75% случаев рак яичников диагностируется лишь на 3-й или 4-й стадиях [5]. Существующие методы диагностики, такие как биопсия, УЗИ, ПЭТ, КТ, МРТ, лапаротомия не позволяют диагностировать рак на ранней стадии из-за маленького размера опухоли. Определение маркера СА 125 в крови также не позволяет диагностировать рак яичников на ранних стадиях [3]. К сожалению, только некоторые виды рака яичников секретируют белок СА 125 на ранней стадии заболевания. Секреция белка прямо зависит от размера опухоли. Поскольку основной целью скрининга является обнаружение опухоли как можно меньших размеров (< 0,5 см), этот маркер не считается достаточно значимым для диагностики. Кроме того, уровень СА 125 может возрастать при других состояниях, в том числе при эндометриозе, фиброзе, менструации и даже при беременности [10].

Отсутствие конкретных признаков и симптомов рака яичников и дефицит программ скрининга приводят к поздней диагностике этого заболевания, что, в свою очередь, приводит к плохой выживаемости этих пациентов.

Поэтому разработка новых методов и подходов к ранней диагностике рака яичников, визуализация раковых клеток в организме является важной задачей.

Одним из подходов к созданию новых методов ранней диагностики опухолей является изучение свойств раковых клеток, идентификация индикаторов развития рака и определение молекулярной мишени в опухолевой клетке. Неинвазивная визуализация биологических процессов *in vivo* требует создания новых зондов молекулярной визуализации.

В настоящее время существует два основных класса зондов: неспецифичные и таргетные, целевые. Неспецифичные зонды подчеркивают различия между тканями по проницаемости и уровням перфузии. Дизайн неспецифичных зондов основан на таких общих свойствах, как размер, заряд и гидрофильность, чтобы определить их распределение в организме [325]. Эти зонды обычно используются для визуализации физиологических процессов, таких как изменения объема крови, перфузии и кровотока в ангиогенезе [585]. Существует множество нецелевых зондов, которые в настоящее время используются в таких методах, как ПЭТ ( $^{13}\text{N}$ -аммоний) и SPECT (99mTc-sestamibi), для перфузионной визуализации [550, 615]. Например, наночастицы из золота, которые накапливаются в опухолях вследствие увеличения проницаемости клеточной мембраны, также используются как зонды в доклинических исследованиях [359].

Таргетные зонды в отличие от неспецифичных зондов нацелены на специфичные молекулы, которые находятся в опухолях. Обычно зонд состоит из двух основных компонентов: таргетного, который может представлять собой химическое соединение, пептид или другую биомолекулу (антитела), способную распознавать и связываться с высоким сродством с конкретным биологическим рецептором, и метки, которая обеспечивает сигнал для обнаружения. В зависимости от выбранного способа метка может представлять собой органические флуорофоры или неорганические квантовые точки для оптического изображения, или радиоизотопы для ядерного изображения [423].

Таргетный компонент зонда может варьировать между химическим соединением (маленькой молекулой), пептидом или антителами. Химические соединения небольшого размера обладают несколькими привлекательными свойствами. Они имеют низкую молекулярную массу, что позволяет им получать доступ ко многим биологическим целям в организме. Химические соединения нелегко обнаруживаются и не расщепляются ферментами. Они могут быть модифицированы, что приводит к большому количеству разнообразных соединений. Однако химические соединения имеют ряд недостатков. Синтез их является трудоемким, длительным и редко приводит к хорошим результатам визуализации [233]. Другой важный недостаток – это ограниченное количество радионуклидов, которое может быть встроено в химические соединения (маленькие молекулы). Вследствие их низкой молекулярной массы, в них невозможно встроить

такой громоздкий радионуклид, как  $^{68}\text{Ga}$ , поэтому сродство такого молекулярного зонда к клеткам будет значительно ниже.

Пептиды имеют много преимуществ по сравнению с другими таргетными компонентами. Использование автоматизированных, твердофазных методов позволяет легко и быстро получать пептиды и их аналоги с повышенной стабильностью и увеличенным периодом полураспада в биологических системах. Кроме того, существует большое количество неприродных коммерчески доступных аминокислот, что расширяет химическое разнообразие пептидов. Такие модифицированные пептиды сложно обнаружить, в организме они не расщепляются ферментами. Кроме того, пептиды остаются стабильными в условиях радиоактивного мечения, когда используются повышенные температуры и органические растворители [6]. Благодаря более высокой молекулярной массе по сравнению с химическими реагентами пептиды способны встраивать в себя различные радионуклиды, включая громоздкие металл-радионуклиды, не понижая аффинности зонда. Также показано, что пептиды обладают высоким сродством к своей мишени даже при наномолярных концентрациях. Пептиды имеют ряд преимуществ перед антителами. Так, они лучше проникают в ткани и опухоли и быстрее выводятся из организма [285, 319]. Синтез пептидов является более простым, быстрым и дешевым, чем получение антител. Кроме того, получаемые антитела не всегда являются абсолютно специфичными.

В настоящее время пептиды, благодаря их преимуществам перед другими таргетными молекулами, все чаще используются в качестве средств визуализации. Это можно видеть по увеличению числа молекулярных зондов на основе пептидов в клинических испытаниях. В качестве примера можно привести [ $^{18}\text{F}$ ] Galacto-RGD, который используется для контроля роста опухоли и образования метастазов, и  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -UBI 29-41 (убиквицидин), который используется для визуализации инфекций [22, 46]. Разработка молекулярного зонда на основе пептида состоит из нескольких стадий. Для создания молекулярного зонда вначале необходимо найти подходящий биомаркер, синтезировать пептид, оценить аффинность и специфичность пептида к мишени *in vitro*, провести биологическую оценку на основе анализа конкурентного связывания, исследовать стабильность пептида в сыворотке и далее изучить его эффективность *in vivo* на животных моделях, чтобы определить, требуется ли его дальнейшая оптимизация.

В различных исследованиях уже выявлены некоторые биомаркеры рака яичников, способствующие раннему обнаружению опухолей, оценке прогноза и ответа на лечение [43, 89, 260, 319]. Однако современные клинические диагностические средства все еще имеют ограниченную эффективность определения ранней стадии рака яичников. В развитии рака яичников участвуют различные генетические факторы и факторы окружающей среды. Например, эстрогены участвуют в опухолевой прогрессии за счет увеличения пролиферации клеток в дополнение к повышению инвазивности или подвижности клеток [460].

Установлено, что ГК, ее олигомеры и гиалурон-связывающие рецепторы (CD44, RHAMM) играют важную роль в прогрессии опухолей яичников [260]. Повышенный синтез мРНК RHAMM обнаружен в карциноме яичников. Показано, что RHAMM участвует в процессах клеточного роста, формировании метастазов рака яичников [43]. В соответствии с данными Oncomine Research (<https://www.oncomine.org/resource/login.html>), RHAMM является биомаркером онкологических заболеваний и может использоваться для идентификации раковых клеток молочной и предстательной желез [320, 546]. Ранее был разработан метод диагностики и прогнозирования рака путем обнаружения комплексов ГК или пептидов с CD44/RHAMM. Показано, что меченые RHAMM-связывающие агенты могут применяться в культуре и *in vivo* для идентификации опухолевых клеток, которые проявляют агрессивный фенотип и характеризуются высоким синтезом RHAMM и CD44 [546]. Важная роль ГК и RHAMM в прогрессии опухолей яичников указывает на них, как на индикаторов развития рака яичников, и как на возможные мишени для ранней диагностики данного заболевания. Повышенный синтез RHAMM в опухолевых клетках по сравнению с нормальными эпителиальными клетками обеспечивает возможность специфичной маркировки раковых клеток [183, 396]. Таргетные RHAMM-пептиды имеют большую перспективу для разработки новых методов диагностики рака яичников, поскольку они обладают несколькими уникальными свойствами. Во-первых, такие пептиды устойчивы к деградации гиалуронидазами. Во-вторых, пептиды действуют в основном как антагонисты, а не агонисты. В-третьих, пептиды не узнаются рецепторами эндотелиальных клеток печени и поэтому могут длительно циркулировать в крови [347]. В-четвертых, эти пептиды могут быть специфичны для изоформ RHAMM или изоформ CD44, присутствующих при патологических состояниях.

Пептиды-лиганды, которые проявляют аффинность и специфичность к RHAMM, были сконструированы с помощью биоинформатических методов и исследованы *in vitro* [163, 320, 546]. Нами показано специфичное связывание VEGEGEEEEGEEY-пептида с рекомбинантным белком RHAMM-CT с помощью методов ProteOn™ XPR36 (система для изучения пептид-белковых взаимодействий) и SPR-анализа (поверхностный плазмонный резонанс), определена константа диссоциации пептида с RHAMM, равная 24 нМ [163]. С помощью метода ELISA мы установили, что FITC-VEGEGEEEEGEEY-пептид конкурирует с ГК за связывание с рекомбинантным белком RHAMM-CT. Кроме того, нами показано, что VEGEGEEEEGEEY-пептид селективно связывается с RHAMM в других клеточных системах, в частности, в клетках рака молочной и предстательной желез [2, 14, 15, 16, 163]. Однако связывание FITC-VEGEGEEEEGEEY-пептида с поверхностью клеток рака яичников не было изучено. Поэтому мы синтезировали FITC-VEGEGEEEEGEEY-пептид и идентифицировали его молекулярную мишень с целью использования этого пептида в дальнейшем в качестве зонда для ранней диагностики рака яични-

ков *in vivo*. Нами показано, что ГК и VEGEGEEEGEEY-пептид специфично связываются с RНАММ на поверхности клеток рака яичников, поскольку блокирование рецептора анти-RНАММ антителами приводило к ингибированию связывания ГК и пептида [19]. Мы установили, что VEGEGEEEGEEY-пептид конкурирует с ГК за центр связывания RНАММ. Нами показано, что FITC-VEGEGEEEGEEY-пептид эффективно связывается с поверхностью клеток рака яичников, в которых повышен синтез RНАММ, и не взаимодействует с фибробластами, нормальными, незлокачественными клетками. Известно, что клетки здоровых яичников также содержат RНАММ, и пониженное содержание этого рецептора приводит к гипофертильности самок [255]. Однако поскольку RНАММ гиперэкспрессируется в клетках рака яичников по сравнению с нормальными клетками, этот FITC-VEGEGEEEGEEY-пептид можно использовать в качестве неинвазивного молекулярного зонда для идентификации раковых клеток яичников, так как очевидно, что при связывании пептида интенсивность флуоресцентного сигнала в раковых клетках будет выше, чем в нормальных. Нами показано, что FITC-VEGEGEEEGEEY-пептид может использоваться для мечения и молекулярной визуализации клеток рака яичников на самой ранней стадии превращения нормальной клетки в раковую клетку. Иммунологический анализ также показал, что FITC-VEGEGEEEGEEY-пептид связывается именно с RНАММ, а не с FcR- или CD44-рецепторами, которые присутствуют также в нормальных клетках. Специфичность связывания FITC-VEGEGEEEGEEY-пептида с RНАММ подтверждена с помощью нокаут фибробластов RНАММ<sup>(-/-)</sup> и фибробластов, трансфицированных с RНАММ<sup>(+/+)</sup> [19]. Ранее было показано, что RНАММ играет важную роль в таких процессах, как заживление тканей, деление клеток, образование митотического веретена и в клеточном цикле. Например, установлено, что добавление рекомбинантного белка RНАММ (изоформа 70 кДа) к фибробластам RНАММ<sup>(-/-)</sup> обеспечивает восстановление подвижности фибробластов, сравнимой с фибробластами дикого типа [572]. В фибробластах и гладкомышечных клетках пораженных тканей также наблюдалось быстрое увеличение синтеза RНАММ [464]. Более того, потеря RНАММ уменьшала миграцию фибробластов в пораженных тканях и ингибировала их дифференцировку в миофибробласты [535, 572]. В нашей работе мы использовали фибробласты RНАММ<sup>(-/-)</sup> и RНАММ<sup>(+/+)</sup> в качестве контроля для подтверждения гипотезы, что FITC-VEGEGEEEGEEY-пептид связывается именно с RНАММ. Нами показано, что связывание FITC-VEGEGEEEGEEY-пептида с поверхностью фибробластов происходило только при наличии в их составе RНАММ [19]. Подобная селективность взаимодействия FITC-VEGEGEEEGEEY-пептида только с RНАММ позволяет предположить, что этот пептид может быть использован для специфичной маркировки и визуализации клеток рака яичников [2, 19].

Таким образом, мы показали, что VEGEGEEEGEEY-пептид может быть эффективным зондом для неинвазивной, ранней молекулярной диагностики рака яичников.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

До данного научного исследования в литературе отсутствовали работы по идентификации и изучению физиологической активности пептидов, селективно взаимодействующих с RНАММ [12]. Поэтому настоящую работу можно считать первым исследованием в этой области. В диссертационной работе нами впервые идентифицированы и синтезированы [14] RНАММ-таргет пептиды, которые представляют собой аминокислотные последовательности  $\alpha$ - и  $\beta$  субъединиц белка тубулина. На основании первоначального скрининга методом SPR были определены константы диссоциации пептидов по отношению к RНАММ и выбрано несколько наиболее перспективных кандидатов для дальнейших исследований [16].

Наши исследования показали, что пептиды, обладающие наибольшим сродством к RНАММ, содержали в своем составе идентичный фрагмент **EEHEEZ** [16]. Также результаты исследования показали, что пептиды, представляющие аминокислотные остатки  $\beta$ -субъединицы тубулина, также демонстрировали высокое сродство [16] связывания с RНАММ. Таким образом, мы показали, что в связывании пептидов участвуют ионные, гидрофобные, водородные и конформационные взаимодействия.

В ходе работы впервые были получены данные о связывании пептидов с рекомбинантным RНАММ-СТ. Результаты исследования показали, что пептиды конкурентно и эффективно замещали ГК на ГК-связывающем центре RНАММ-СТ. Следует подчеркнуть, что полученные пептиды были достаточно стабильны в сыворотке крови и показали приемлемое время полураспада.

В этой диссертационной работе мы впервые показали, что пептиды специфично связываются с RНАММ опухолевых клеток молочной, предстательной желез и рака яичников. Таким образом, результаты диссертационной работы свидетельствуют о том, что RНАММ-таргет пептиды могут применяться для специфичной маркировки и визуализации опухолевых клеток с целью ранней диагностики онкологических заболеваний.

В диссертационной работе мы впервые исследовали терапевтический потенциал RНАММ-таргет пептидов. В частности, мы изучили влияние пептидов на жизнеспособность клеток рака молочной и предстательной желез и показали, что пептиды обладают цитостатической активностью. Следует подчеркнуть, что жизнеспособность клеток рака молочной и предстательной желез значительно подавлялась низкими концентрациями пептидов, что свидетельствует о преимуществе этих пептидов для применения в качестве потенциальных противоопухолевых препаратов. Кроме того мы исследовали влияние пептидов на апоптоз и некроз опухолевых клеток. Наши исследования впервые показали, что RНАММ-таргет пептиды значительно повышали индукцию апоптоза и некроза в опухолевых клетках, и, следовательно, они обладают апоптотической активностью [2]. Следует отметить, что пептиды не влияли на апоптоз и некроз

RHAMM<sup>(-/-)</sup> фибробластов [2]. Впервые нами показано, что индукция апоптоза происходит по митохондриальному пути, так как наблюдается активация каспаз-3/7.

Таким образом, мы впервые показали, что RHAMM-таргет пептиды действуют адресно на опухолевые клетки и их эффект является RHAMM-опосредованным.

В диссертационной работе также было показано, что блокирование RHAMM с помощью RHAMM-таргет пептидов приводит к ингибированию инвазивности клеток РМЖ и РПЖ. Эти результаты подтверждают литературные данные об участии RHAMM в процессах миграции, инвазивности опухолевых клеток [16]. В данной работе мы также впервые показали, что RHAMM-таргет пептиды, связываясь на RHAMM рецепторе, индуцируют морфологические изменения в клетках, вызывают структурную дезорганизацию актина и тем самым подавляют формирование инвадоподий [16, 18].

Полученные результаты показали, что RHAMM-таргет пептиды обладают антиметастатическим потенциалом. В результате исследования было выявлено, что RHAMM-таргет пептиды подавляют образование клеток старения (senescence cells), что свидетельствует об их сенолитическом потенциале.

Следует отметить, что большая часть работы по изучению влияния RHAMM-таргет пептидов выполнена в условиях *in vitro* в бесклеточных системах или на клеточных культурах [14]. Однако мы также показали, что RHAMM-таргет пептиды *in vivo* подавляют рост опухолей у ксенографтов, то есть обладают противоопухолевой активностью [14]. Эти данные позволяют предположить, что RHAMM-таргет пептиды могут быть использованы для таргетной терапии рака, поскольку они являются специфичными для опухолевых клеток и легко синтезируемыми соединениями.

В этом смысле полученные нами данные открывают новое направление для терапии онкологических заболеваний с помощью пептидов-антагонистов, адресно направленных на индукцию процессов апоптоза, ингибирование жизнеспособности и инвазивности опухолевых клеток. Однако, необходимы дальнейшие исследования о модуляции активности RHAMM с помощью RHAMM-таргет пептидов, идентификация белков апоптоза, взаимодействующих с RHAMM. Хотелось бы более глубоко изучить влияние RHAMM-таргет пептидов на появление клеток старения и понять их роль в процессах развития инвазивности. Также планируется в дальнейшем изучить роль ГК/RHAMM сигнального пути и RHAMM-таргет пептидов в регуляции синтеза и функционирования белков множественной лекарственной устойчивости.

Для практического использования RHAMM-таргет пептидов в онкологии необходимы дальнейшие исследования механизма их действия с последующей перспективой проведения доклинических испытаний.

Таким образом, начатая нами тема исследования имеет перспективу дальнейшей разработки. В настоящее время изучение молекулярных механизмов взаимодействия RНАММ-таргет пептидов с RНАММ рецептором для диагностических, прогностических и терапевтических целей является одним из приоритетных направлений биомедицины.

## ВЫВОДЫ

1. Идентифицированы и синтезированы RНАММ-таргет пептиды, соответствующие СТТ- и H12-областям аминокислотных последовательностей  $\alpha$ - и  $\beta$ -тубулина.

2. Разработан высокоэффективный метод получения рекомбинантного RНАММ-СТ белка, позволяющий получить гомогенный белок с высоким выходом (степень чистоты более 90%, выход 50 мг/л культуры *E.coli*).

3. Впервые установлено, что RНАММ-таргет пептиды специфично связываются с рекомбинантным RНАММ-СТ на ГК-связывающем центре. Вычислены константы диссоциации пептидов (VEGEGEEEGEEY,  $K_D = 24$  нМ), (EEDFGEEAEEEA,  $K_D = 32$  нМ), (FTEAESNMNDLV,  $K_D = 30$  нМ), свидетельствующие о высоком сродстве их связывания с RНАММ рецептором.

4. Выявлена взаимосвязь между структурой пептидов и их способностью связываться с RНАММ рецептором. Установлено, что аминокислотный фрагмент EEXEEZ в составе RНАММ-таргет пептидов является необходимым для связывания с RНАММ. Доказана роль ключевых аминокислот E (глутаминовая кислота), G (глицин), Y (тирозин), поскольку их замена на аминокислоту Ala (аланин) приводит к значительному снижению сродства пептидов к RНАММ.

5. Продемонстрирована стабильность RНАММ-таргет пептидов в сыворотке крови и приемлемое время полураспада (2-4 часа), что указывает на возможность применения пептидов для визуализации опухолевых клеток и терапии рака.

6. Получен комплекс биохимических данных, свидетельствующих о целенаправленном взаимодействии RНАММ-таргет пептидов с раковыми клетками. Выявлено, что пептиды специфично связываются с RНАММ рецептором на поверхности опухолевых клеток молочной, предстательной желез и рака яичников; однако пептиды не связываются с нормальными клетками [MEF и фибробластами RНАММ<sup>(-/)</sup>]. Благодаря специфичной природе взаимодействия пептидов с RНАММ рецептором, RНАММ-таргет пептиды могут использоваться в молекулярной диагностике онкологических заболеваний на ранней стадии.

7. Впервые получены экспериментальные данные о терапевтическом потенциале RНАММ-таргет пептидов. Показано, что RНАММ-таргет пептиды обладают цитостатической, апоптотической и антиметастатической активностью по отношению к опухолевым клеткам молочной железы: ингибируют жизнеспособность, пролиферацию клеток на 50% ( $p < 0,05$ ); инду-

цируют апоптоз и некроз в 4-5 раз ( $p < 0,05$ ); стимулируют активность каспаз-3/7 на 30% ( $p < 0,05$ ); подавляют инвазивность раковых клеток на ~80% ( $p < 0,05$ ); однако не влияют на апоптоз и некроз нормальных клеток (MEF) и клеток RНАММ<sup>(-/-)</sup>. Выявлено, что RНАММ-таргет пептиды действуют адресно на раковые клетки и их эффект проявляется при низких концентрациях (10 мкг/мл,  $2 \times 10^{-7} \text{M}$ ), что является реальным преимуществом для использования этих пептидов в качестве потенциальных противоопухолевых препаратов.

8. Обнаружено, что популяция раковых клеток молочной железы является гетерогенной и состоит из двух типов клеток: крупных, многоядерных, неинвазивных (клетки старения) и мелких, инвазивных клеток. Установлено, что RНАММ-таргет пептиды индуцируют стресс актиновых волокон, подавляют образование инвадоподий и уменьшают количество клеток старения в 4 раза ( $p < 0,05$ ), что свидетельствует об их сенолитическом потенциале.

9. Впервые показано, что RНАММ-таргет пептиды специфично воздействуют на раковые клетки предстательной железы, понижают жизнеспособность, пролиферацию клеток на ~ 90% ( $p < 0,05$ ); индуцируют апоптоз и активность каспаз-3/7 в 2 раза ( $p < 0,05$ ); подавляют инвазивность клеток на ~90% ( $p < 0,05$ ), но при этом не влияют на апоптоз нормальных клеток и нокаут фибробластов RНАММ<sup>(-/-)</sup>. Продемонстрировано, что 8-ми мерные пептиды (GEGEEGEE и DFGEEAEE) сохраняют свойства 12-мерных пептидов: специфично связываются с раковыми клетками, подавляют инвазивность клеток на 93 и 89%, соответственно ( $p < 0,05$ ). Эти данные свидетельствуют о возможности использования RНАММ-таргет пептидов в клеточной терапии рака предстательной железы.

10. Установлено впервые, что пептид RYQLHPYR специфично связывается с RНАММ на поверхности клеток рака предстательной железы, понижает жизнеспособность клеток на ~ 80% ( $p < 0,05$ ); подавляет инвазивность на 99% ( $p < 0,05$ ); повышает активность каспаз-3/7 в 2 раза ( $p < 0,05$ ); индуцирует апоптоз в 10 раз и некроз в 2 раза ( $p < 0,05$ ); однако не влияет на апоптоз и некроз нормальных и нокаут фибробластов. Следовательно, пептид RYQLHPYR селективно влияет на опухолевые клетки, не затрагивая жизнеспособность нормальных клеток, и его действие осуществляется через RНАММ рецептор.

11. Впервые в условиях *in vitro* установлено, что ГК-Cy5.5 и FITC-VEGEGEEEGEEY пептид специфично связываются с RНАММ на поверхности клеток рака яичников, при этом пептид не взаимодействует с нокаут фибробластами RНАММ<sup>(-/-)</sup>; однако интенсивно связывается с фибробластами, трансфицированными с RНАММ<sup>(+/+)</sup>. Эта селективность взаимодействия пептида с раковыми клетками указывает на то, что FITC-VEGEGEEEGEEY пептид можно использовать в качестве неинвазивного зонда для ранней молекулярной диагностики рака яичников.

12. Впервые показано, что RНАММ-таргет пептиды (GEGEEGEE, DFGEEAEE и RYQLHPYR) проявляют противоопухолевую активность *in vivo*, подавляя рост опухолей мышечных ксенографтов на 58%, 63,5% и 94,6% ( $p < 0,05$ ), соответственно. Полученный комплекс данных свидетельствует о том, что RНАММ-таргет пептиды, благодаря своей стабильности и способности специфично связываться с опухолевыми клетками, подавлять их жизнеспособность, пролиферацию, инвазивность имеют потенциал для использования в качестве тераностиков злокачественных новообразований различной локализации.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

- BCA – бычий сывороточный альбумин
- PBS – фосфатно-солевой буфер (*от англ. Phosphate sodium buffer*)
- pNA – фенил-нитроанилид (*от англ. Phenyl-nitroanilide*)
- DAPI – 4, 6-диамидино-2-фенилиндол (*от англ. 4, 6-diamidino-2-phenylindole*)
- FITC – флуоресцеин изотиоцианат (*от англ. Fluorescein isothiocyanate*)
- Cy5.5 – флуоресцентный краситель, цианин 5 (*от англ. Cyanine 5*)
- FBS – эмбриональная телячья сыворотка (*от англ. Fetal Bovine Serum*).
- PMЖ – рак молочной железы
- ППЖ – рак предстательной железы
- DMEM – Дульбекко модифицированная ростовая среда (*от англ. Dulbecco's modified Eagle's medium*)
- ELISA – иммуноферментный анализ (*от англ. Enzyme-linked immunosorbent assay*)
- TMB – 3, 3', 5, 5'-тетраметилбензидин (*от англ. 3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine*)
- RHAMM/HMMR – рецептор гиалуронан опосредованной подвижности (*от англ. Receptor for hyaluronan mediated motility/*Hyaluronan-mediated motility receptor)
- ГК – гиалуроновая кислота (*от англ. Hyaluronic acid*)
- ВЭЖХ – высоко-эффективная жидкостная хроматография
- SPR – поверхностный плазмонный резонанс (*от англ. Surface plasmon resonance*)
- ESI-MS – электроспрей ионизационная масс-спектрометрия (*от англ. Electrospray ionization mass spectrometry*)
- ECM – внеклеточный матрикс (*от англ. Extra cellular matix*)
- FcR – иммуноглобулин-подобный рецептор (*от англ. Fragment crystallizable region*)
- Fmoc – твердофазный пептидный синтез (*от англ. Fmoc deprotection and amino acid coupling Cycles*)
- AMP – антимикробные пептиды (*от англ. Antimicrobial peptides*)
- CPP – клеточно-проникающие пептиды (*от англ. Cell-penetrating peptides*)
- ТТР – опухоль-таргетные пептиды (*от англ. Tumor-targeting peptides*)
- Дох – доксорубицин
- ПЭГ – полиэтиленгликоль
- AlamarBlue реагент – резазурин (*от англ. Resazurin*)
- МАР – белки, ассоциированные с микротрубочками (*от англ. Microtubules associated proteins*)
- МАРК – киназа, связанная с микротрубочками (*от англ. Microtubule associated protein kinase*)
- АФК – активные формы кислорода
- FDA – Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (*от англ. U.S. Food and Drug Administration*)
- HEPES – буфер (*от англ. 4-(2-Hydroxyethyl) piperazine-1-ethanesulfonic acid*)

- EDAC – 1-этил-3-диметиламинопропилкарбодиимид (*от англ.* 1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl) carbodiimide, Hydrochloride)
- сульфо-NHS – N-Гидроксисукцинимид (*от англ.* N-hydroxysulfosuccinimide)
- 4-MU – 4-метилумбеллиферон (*от англ.* 4-methylumbelliferone)
- IPTG – изопропил- $\beta$ -D-1-тиогалактопиранозид (*от англ.* Isopropyl  $\beta$ -d-1-thiogalactopyranoside)
- HYAL1, HYAL2 – гиалуронидазы 1, 2 (*от англ.* Hyaluronidase-1)
- HAS1, HAS2, HAS3 – гиалуронан синтазы 1, 2, 3 (*от англ.* Hyaluronan synthases)
- MEF – мышинные эмбриональные фибробласты (*от англ.* Mouse Embryonic Fibroblasts)
- SEREX – серологический скрининг библиотек экспрессии кДНК (*от англ.* Serological analysis of expression cDNA libraries)
- ПЭТ – позитронно-эмиссионная томография (*от англ.* Positron emission tomography)
- МРТ – магнитно-резонансная томография (*от англ.* Magnetic resonance tomography)
- BrdU – бромдезоксисуридин (*от англ.* Bromodeoxyuridine)
- TNF – фактор некроза опухоли (*от англ.* Tumor necrosis factor, cachexin)
- SST – соматостатин (*от англ.* Somatostatin)
- VEGF – фактор роста эндотелия сосудов (*от англ.* Vascular endothelial growth factor)
- TAT пептид – получен из трансаktиватора транскрипции вируса иммунодефицита человека (*от англ.* transactivator of transcription)
- HNP1, HNP2, HNP3 – альфа-дефензины (*от англ.* Alpha defensins)
- ZIP – лейциновая застёжка-молния (*от англ.* Leucine zipper)
- bZIP – основная область лейциновой застёжки-молнии (*от англ.* Basic-region leucine zipper)
- UDP – уридин дифосфат (*от англ.* Uridine diphosphate)
- ТФК – трифторуксусная кислота

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Акентьева, Н. П. Изучение противоопухолевой активности синтетического пептида RYQLHPYR на клетках рака предстательной железы / Н. П. Акентьева, С. С. Шушанов // Российский биотерапевтический журнал. – 2019. – Т. 18, № 2. – С. 40–50.
2. Акентьева, Н. П. RHAMM (рецептор гиалуронан-опосредованной подвижности)-таргет пептиды индуцируют апоптоз клеток рака предстательной железы / Н. П. Акентьева, С. С. Шушанов // Вопросы онкологии. – 2016. – Т. 62, № 3. – С. 512–518.
3. Бохман, Я. В. Выявление солитарных и первично-множественных опухолей в женской репродуктивной системе на основании селективного скрининга / Я. В. Бохман, С. Я. Максимов, Е. В. Бахидзе // Новая медицинская технология. – СПб. : Изд-во Н-Л., 2008. – С. 40–45.
4. ВОЗ. Рак молочной железы: профилактика и борьба // WHO. – URL: <https://www.who.int/ru> (дата обращения: 10.06.2019).
5. Залуцкий, И. В. Методические и организационные принципы селективного скрининга рака шейки матки, тела матки и яичников / И. В. Залуцкий // Вопросы онкологии. – 2006. – Т. 52, № 1. – С. 74–77.
6. Золотарев, Ю. А. Количественный анализ пептида hldf-6-амида и его метаболитов в тканях лабораторных животных с использованием их меченных тритием и дейтерием производных / Ю. А. Золотарев, А. К. Дадаян, Н. В. Кост [и др.] // Биоорганическая химия. – 2015. – Т. 41, № 6. – С. 644–656.
7. Копыльцов, Е. И. Онкологические заболевания органов мочеполовой системы / Е. И. Копыльцов, А. И. Новиков, В. К. Косенок [и др.] // Онкология. Кн. 4. – Омск : Изд-во Центра МО и ИТ Омской гос. мед. академии, 2008. – 197 с.
8. Никогосян, С. О. Современная диагностика рака яичников / С. О. Никогосян, В. В. Кузнецов // Российский онкологический журнал. – 2013. – № 5. – С. 52–57.
9. Трещалина, Е. М. Методические рекомендации по доклиническому изучению противоопухолевой активности лекарственных средств / Е. М. Трещалина // Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. – М. : Грифф и К., 2012. – С. 642–657.
10. Чиссов, В. И. Ошибки в клинической онкологии: руководство для врачей / В. И. Чиссов, А. Х. Трахтенберг. – М. : Медицина. 2001. – 544 с.
11. Accardo, A. Receptor binding peptides for targetselective delivery of nanoparticles encapsulated drugs / A. Accardo, L. Aloj, M. Aurilio [et al.] // Int. J. Nanomedicine. – 2014. – Vol. 9. – P. 1537–1557.
12. Agrawal, P. CPPsite 2.0: arepository of experimentally validated cell-penetrating peptides / P. Agrawal, S. Bhalla, S. S. Usmani [et al.] // Nucleic Acids Res. – 2016. – Vol. 44. – D1098–D1103.
13. Aina, O. H. Therapeutic cancer targeting peptides / O. H. Aina, T. C. Sroka, M. L. Chen, K. S. Lam // Biopolymers. – 2002. – Vol. 66, № 3. – P. 184–199.
14. Akenteva, N. P. Effects of RHAMM/HMMR-selective peptides on survival of breast cancer cells / N. P. Akenteva, S. S. Shushanov, A. I. Kotelnikov // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 2015. – Vol. 159, № 5. – P. 618–621.
15. Akentieva, N. P. Inhibition of cancer cell invasiveness by the synthetic peptides GEGEEGEE and DFGEEAEE / N. P. Akentieva, S. S. Shushanov // Biochemistry (Moscow), Supplement Series A: Membrane and Cell Biology. – 2017. – Vol. 11, № 1. – P. 24–34.
16. Akentieva, N. P. Inhibitory effect of RHAMM-target peptides on invasion of breast cancer cells / N. P. Akentieva, S. S. Shushanov // Problems in oncology. – 2016. – Vol. 62, № 6. – P. 831–7.
17. Akentieva, N. P. Antitumor Effects of RHAMM-Target Peptides on Prostate Tumor Xenografts in Nude Mice / N. P. Akentieva // Chinese Journal of Surgical Oncology. – 2020. – Vol. 1, № 1. – P. 1–6.
18. Akentieva, N. P. RHAMM-target peptides inhibit invasion of breast cancer cells / N. P. Akentieva // EuroBiotechnology J. – 2017. – Vol. 1. – P. 138–148.

19. Akentieva, N. P. Visualization of ovarian cancer cells with peptide VEGEGEEGEEY / N. P. Akentieva, S. S. Shushanov // *Biochemistry (Moscow), Supplement Series A: Membrane and Cell Biology*. – 2018. Vol. 12, № 2. – P. 189–98.
20. Akentieva, N. P. RHAMM-target Peptides Inhibit Proliferation and Viability of Cancer Cells / N. P. Akentieva, A. F. Topunov // *Biointerface Research in Applied Chemistry*. – 2021. – Vol. 11, № 4. – P. 12252–12266.
21. Akerman, M. E. Nanocrystal targeting in vivo / M. E. Akerman, W. C. Chan, P. [et al.] Laakkonen // *Proc. Natl. U S A*. – 2002. – Vol. 99, № 20. – P. 12617–12621.
22. Akhtar, M. S. Antimicrobial peptide 99mTc-ubiquicidin 29-41 as human infection-imaging agent: clinical trial / M. S. Akhtar, A. Qaisar, J. Irfanullah [et al.] // *J. Nucl. Med*. – 2005. – Vol. 46. – P. 567–573.
23. Akiyama, Y. Hyaluronate receptors mediating glioma cell migration and proliferation / Y. Akiyama, S. Jung, B. Salhia [et al.] // *J. Neurooncol*. – 2001. – Vol. 53, № 2. – P. 115–127.
24. Albericio, F. Solid-phase synthesis: a practical guide (1 ed.) / F. Albericio. – Boca Raton : CRC Press, 2000. – P. 848–849.
25. Alberts, B. Molecular biology of the cell / B. Alberts [et al.]. – 5th edition. – Garland science, 2008. – 1601 p.
26. Alhakamy, N. A. Polyarginine molecular weight determines transfection efficiency of calcium condensed complexes / N. A. Alhakamy, C. J. Berkland // *Mol. Pharm*. – 2013. – Vol. 10. – P. 1940–1948.
27. Alizadeh, A. M. Metastasis review: from bench to bedside / A. M. Alizadeh, S. Shiri, S. Farsinejad // *Tumour Biol*. – 2014. – Vol. 35, № 9. – P. 8483–8523.
28. Amano, T. Antitumor effects of vaccination with dendritic cells transfected with modified receptor for hyaluronan-mediated motility mRNA in a mouse glioma model / T. Amano, K. Kajiwara, K. Yoshikawa [et al.] // *J. Neurosurg*. – 2007. – Vol. 106. – P. 638–645.
29. Amemiya, K. Hyaluronan-binding motif identified by panning a random peptide display library / K. Amemiya, T. Nakatani, A. Saito [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta*. – 2005. – Vol. 1724. – P. 94–99.
30. Ananias, H. J. Application of (99m)Technetium-HYNIC(tricine/TPPTS)-Aca-Bombesin(7-14) SPECT/CT in prostate cancer patients: a first-in-man study / H. J. Ananias, Z. Yu, H. D. Hoving [et al.] // *Nucl. Med. Biol*. – 2013. – Vol. 40, № 7. – P. 933–938.
31. Arap, W. Cancer treatment by targeted drug delivery to tumor vasculature in a mouse model / W. Arap, R. Pasqualini, E. Ruoslahti // *Science*. – 1998. – Vol. 279. – P. 377–380.
32. Aroui, S. Cytotoxicity, intracellular distribution and uptake of doxorubicin and doxorubicin coupled to cell-penetrating peptides in different cell lines: a comparative study / S. Aroui, S. Brahim, M. D. Waard, A. Kenani // *Biochem. Biophys. Res. Commun*. – 2010. – Vol. 391. – P. 419–425.
33. Aroui, S. Efficient induction of apoptosis by doxorubicin coupled to cell-penetrating peptides compared to unconjugated doxorubicin in the human breast cancer cell line MDA-MB-231 / S. Aroui, S. Brahim, W. M. De [et al.] // *Cancer Lett*. – 2009. – Vol. 285. – P. 28–38.
34. Assmann, V. The pattern of expression of the microtubule-binding protein RHAMM/IHABP in mammary carcinoma suggests a role in the invasive behaviour of tumour cells / V. Assmann, C. E. Gillett, R. Poulson [et al.] // *J. Pathol*. – 2001. – Vol. 195. – P. 191–196.
35. Assmann, V. The intracellular hyaluronan receptor RHAMM/IHABP interacts with microtubules and actin filaments / V. Assmann, D. Jenkinson, J. F. Marshall, I. R. Hart // *J. Cell Sci*. – 1999. – Vol. 112. – P. 3943–3954.
36. Assmann, V. The human hyaluronan receptor RHAMM is expressed as an intracellular protein in breast cancer cells / V. Assmann, J. F. Marshall, C. Fieber [et al.] // *J. Cell Sci*. – 1998. – Vol. 111, pt. 12. – P. 1685–1694.
37. Avenoso, A. Hyaluronan in experimental injured/inflamed cartilage: in vivo studies / A. Avenoso, A. D'Ascola, M. Scuruchi [et al.] // *Life Sci*. – 2018. – Vol. 193. – P. 132–140.

38. Babasola, O. Chemically modified N-acylated hyaluronan fragments modulate proinflammatory cytokine production by stimulated human macrophages / O. Babasola, K. J. Rees-Milton, S. Bebe [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2014. – Vol. 289, № 36. – P. 24779–24791.
39. Bafna, S. Membrane-bound mucins: the mechanistic basis for alterations in the growth and survival of cancer cells / S. Bafna, S. Kaur, S. K. Batra // *Oncogene.* – 2010. – Vol. 29. – P. 2893–2904.
40. Balkwill, F. R. The chemokine system and cancer / F. R. Balkwill // *J. Pathol.* – 2012. – Vol. 226. – P. 148–157.
41. Banerji, S. Distinctive properties of the hyaluronan-binding domain in the lymphatic endothelial receptor Lyve-1 and their implications for receptor function / S. Banerji, B. R. Hide, J. R. James [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2010. – Vol. 285. – P. 10724–10735.
42. Baryshnikov, A. Yu. Immunological problems of apoptosis / A. Yu. Baryshnikov, Yu. V. Shishkin. – M. : Editorial URSS, 2002. – 320 p.
43. Bauer, J. Antigen targets for the development of immunotherapies in leukemia / J. Bauer, A. Nelde, T. Bilich., J. S. Walz // *Int. J. Mol. Sci.* – 2019. – Vol. 20, № 6. – P. 1397.
44. Bechara, C. Cell-penetrating peptides: 20 years later, where do we stand? / C. Bechara, S. Sagan // *FEBS Lett.* – 2013. – Vol. 587. – P. 1693–1702.
45. Becker-Weimann, S. NFκB disrupts tissue polarity in 3D by preventing integration of microenvironmental signals / S. Becker-Weimann, G. Xiong, S. Furuta [et al.] // *Oncotarget.* – 2013. – Vol. 4, № 11. – P. 2010–2020.
46. Beer, A. J. PET-based human dosimetry of 18F-galacto-RGD, a new radiotracer for imaging alpha v beta3 expression / A. J. Beer, R. Haubner, I. Wolf, M. Goebel [et al.] // *J. Nucl. Med.* – 2006. – Vol. 47. – P. 763–769.
47. Begum, A. A. Investigation of bombesin peptide as a targeting ligand for the gastrin releasing peptide (GRP) receptor / A. A. Begum, P. M. Moyle, I. Toth // *Bioorg. Med. Chem.* – 2016. – Vol. 24, № 22. – P. 5834–5841.
48. Benitez, A. Dietary supplement hymecromone and sorafenib: a novel combination for the control of renal cell carcinoma / A. Benitez, T. J. Yates, N. Shamaldevi [et al.] // *J. Urol.* – 2013. – Vol. 190, № 1. – P. 285–290.
49. Bergin, B. J. Oral hyaluronan gel reduces post operative tarsocrural effusion in the yearling thoroughbred / B. J. Bergin, S. W. Pierce, L. R. Bramlage, A. Stromberg // *Equine Vet. J.* – 2006. – Vol. 38. – P. 375–378.
50. Bernert, B. Hyaluronan synthase 2 (HAS2) promotes breast cancer cell invasion by suppression of tissue metalloproteinase inhibitor1 (TIMP-1) / B. Bernert, H. Porsch, P. Heldin // *J. Biol. Chem.* – 2011. – Vol. 286. – P. 42349–42359.
51. Bevers, E. M. Regulatory mechanisms in maintenance and modulation of transmembrane lipid asymmetry: pathophysiological implications / E. M. Bevers, P. Comfurius, R. F. Zwaal // *Lupus.* – 1996. – Vol. 5. – P. 480–487.
52. Bhat, R. Of plasticity and specificity: dialectics of the micro- and macro-environment and the organ phenotype / R. Bhat, M. J. Bissell // *Wiley Interdiscip. Rev. Membr. Transp. Signal.* – 2014. – Vol. 3, № 2. – P. 147–63.
53. Bidwell, G. L. 3rd. Therapeutic peptides for cancer therapy. Part I – peptide inhibitors of signal transduction cascades / G. L. Bidwell 3rd, D. Raucher // *Expert. Opin. Drug Deliv.* – 2009. – Vol. 6, № 10. – P. 1033–1047.
54. Bilusic, M. Therapeutic cancer vaccines: the latest advancement in targeted therapy / M. Bilusic, R. A. Madan // *Am. J. Ther.* – 2012. – Vol. 19 (6). – P. e172–e181.
55. Bissell, M. J. The organizing principle: micro environmental influences in the normal and malignant breast / M. J. Bissell, D. C. Radisky, A. Rizki [et al.] // *Differentiation.* – 2002. – Vol. 70. – P. 537–546.
56. Biswas, S. Nanopreparations for organelle-specific delivery in cancer / S. Biswas, V. P. Torchilin // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2014. – Vol. 66. – P. 26–41.
57. Bohaumilitzky, L. A trickster in disguise: hyaluronan's ambivalent roles in the matrix / L. Bohaumilitzky, A. K. Huber, E. M. Stork [et al.] // *Front. Oncol.* – 2017. – Vol. 7. – P. 242.

58. Bohrer, L. R. Activation of the FGFR-STAT3 pathway in breast cancer cells induces a hyaluronan-rich microenvironment that licenses tumor formation / L. R. Bohrer, P. Chuntova, L. K. Bade [et al.] // *Cancer Res.* – 2014. – Vol. 74. – P. 374–386.
59. Bohrer, L. R. Macrophages promote fibroblast growth factor receptor-driven tumor cell migration and invasion in a CXCR2-dependent manner / L. R. Bohrer, K. L. Schwertfeger. // *Mol. Cancer Res.* – 2012. – Vol. 10. – P. 1294–1305.
60. Boleti, H. Xklp2, a novel *Xenopus* centrosomal kinesin-like protein required for centrosome separation during mitosis / H. Boleti, E. Karsenti, I. Vernos // *Cell.* – 1996. – Vol. 84. – P. 49–59.
61. Bolhassani, A. Potential efficacy of cell-penetrating peptides for nucleic acid and drug delivery in cancer / A. Bolhassani // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2011. – Vol. 1816. – P. 232–246.
62. Boohaker, R. J. The use of therapeutic peptides to target and to kill cancer cells / R. J. Boohaker, M. W. Lee, P. Vishnubhotla [et al.] // *Curr. Med Chem.* – 2012. – Vol. 19, № 22. – P. 3794–3804.
63. Bordet, T. Identification and Characterization of TRO19622 (4-Cholesten-3-one, Oxime), a novel compound for the treatment Amyotrophic Lateral Sclerosis / T. Bordet, B. Buisson, M. Michaud [et al.] // *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* – 2007. – Vol. 322 (2). – P. 709–720.
64. Borghouts, C. Current strategies for the development of peptide-based anticancer therapeutics / C. Borghouts, C. Kunz, B. Groner // *J. Pept. Sci.* – 2005. – Vol. 11, № 11. – P. 713–726.
65. Borrelli, A. The functional role of MnSOD as a biomarker of human diseases and therapeutic potential of a new isoform of a human recombinant MnSOD / A. Borrelli, A. Schiattarella, P. Bonelli [et al.] // *Biomed. Res. Int.* – 2014. – Vol. 2014. – P. 476789.
66. Borrelli, A. Cell penetrating peptides as molecular carriers for anti-cancer agents / A. Borrelli, A. L. Tornesello, M. L. Tornesello [et al.] // *Molecules.* – 2018. – Vol. 23, № 295. – P. 1–28.
67. Bose, N. Role of RHAMM within the hierarchy of well-established prognostic factors in colorectal cancer / N. Bose, A. M. Masellis // *Gut.* – 2008. – Vol. 57, № 10. – P. 1413–1419.
68. Boudreau, A. An "elite hacker": breast tumors exploit the normal microenvironment program to instruct their progression and biological diversity / A. Boudreau, L. J. van't Veer, M. J. Bissell // *Cell Adh. Migr.* – 2012. – Vol. 6, № 3. – P. 236–248.
69. Bourguignon, L. Y. W. Interaction between the adhesion receptor, CD44, and the oncogene product, p185HER2, promotes human ovarian tumor cell activation / L. Y. W. Bourguignon, H. B. Zhu, A. Chu [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1997. – Vol. 272, № 44. – P. 27913–27918.
70. Bourguignon, L. Y. W. CD44 interaction with c-Src kinase promotes cortactin-mediated cytoskeleton function and hyaluronic acid-dependent ovarian tumor cell migration / L. Y. W. Bourguignon, H. Zhu, L. Shao, Y. W. Chen // *J. Biol. Chem.* – 2001. – Vol. 276, № 10. – P. 7327–7336.
71. Bourguignon, L. Y. Hyaluronan-CD44 interaction promotes c-Src-mediated twist signaling, microRNA-10 expression, and RhoA/RhoC up-regulation, leading to Rho-kinase-associated cytoskeleton activation and breast tumor cell invasion / L. Y. Bourguignon, G. Wong, C. Earle [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2010. – Vol. 285. – P. 36721–36735.
72. Bourguignon, L. Y. W. Activation of matrix hyaluronan-mediated CD44 signaling, epigenetic regulation and chemoresistance in head and neck cancer stem cells / L. Y. W. Bourguignon, C. Earle, M. Shiina // *Int. J. Mol. Sci.* – 2017. – Vol. 18, № 9. – pii: E1849.
73. Bourguignon, L. Y. Up-regulation of histone methyltransferase, DOT1L, by matrix hyaluronan promotes microRNA-10 expression leading to tumor cell invasion and chemoresistance in cancer stem cells from head and neck squamous cell carcinoma / L. Y. Bourguignon, G. Wong, M. Shiina // *J. Biol. Chem.* – 2016. – Vol. 291, № 20. – P. 10571–10585.
74. Bourguignon L. Y. W. Matrix hyaluronan-CD44 interaction activates microRNA and LncRNA signaling associated with chemoresistance, invasion, and tumor progression / L. Y. W. Bourguignon // *Front. Oncol.* – 2019. – Vol. 9. – P. 492.
75. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M. M. Bradford // *Anal. Biochem.* – 1976. – Vol. 72. – P. 248–254.

76. Branco, M. C. Materials from peptide assembly: towards the treatment of cancer and transmittable disease / M. C. Branco, D. M. Sigano, J. P. Schneider // *Curr. Opin. Chem. Biol.* – 2011. – Vol. 15. – P. 427–434.
77. Brassart-Pasco, S. Tumor microenvironment: extracellular matrix alterations influence tumor progression / S. Brassart-Pasco, S. Brézillon, B. Brassart [et al.] // *Front. Oncol.* – 2020. – Vol. 10. – P. 397.
78. Brogden, K. A. Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria / K. A. Brogden // *Nat. Rev. Microbiol.* – 2005. – Vol. 3, № 3. – P. 238–250.
79. Bröker, L. E. Cell death independent of caspases: a review / L. E. Bröker, F. A. Kruyt, G. Giaccone // *Clin. Cancer Res.* – 2005. – Vol. 11, № 9. – P. 3155–3162.
80. Brooks, P. C. Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis / P. C. Brooks, R. A. Clark, D. A. Cheresh // *Science.* – 1994. – Vol. 264. – P. 569–571.
81. Brownfield, D. G. Patterned collagen fibers orient branching mammary epithelium through distinct signaling modules / D. G. Brownfield, G. Venugopalan, A. Lo [et al.] // *Curr. Biol.* – 2013. – Vol. 23, № 8. – P. 703–709.
82. Bryan, P. N. Protein engineering of subtilisin / P. N. Bryan // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2000. – Vol. 1543. – P. 203–222.
83. Bulinski, J. C. Immunofluorescence localization of HeLa cell microtubule-associated proteins on microtubules in vitro and in vivo / J. C. Bulinski, G. G. Borisy // *J. Cell Biol.* – 1980. – Vol. 87, № 3, pt 1. – P. 792–801.
84. Bunt, S. K. Inflammation induces myeloid-derived suppressor cells that facilitate tumor progression / S. K. Bunt, P. Sinha, V. K. Clements [et al.] // *J. Immunol.* – 2006. – Vol. 176. – P. 284–290.
85. Burger, J. A. CXCR4: a key receptor in the crosstalk between tumor cells and their microenvironment / J. A. Burger, T. J. Kipps // *Blood.* – 2006. – Vol. 107. – P. 1761–1767.
86. Burgoyne, L. A. Mammalian chromatin substructure studies with the calcium-magnesium endonuclease and two-dimensional polyacrylamide-gel electrophoresis / L. A. Burgoyne, D. R. Hewish, J. Mobbs // *Biochem. J.* – 1974. – Vol. 143, № 1. – P. 67–72.
87. Burnett, A. Therapeutic advances in acute myeloid leukemia / A. Burnett, M. Wetzler, B. Lowenberg // *J. Clin. Oncol.* – 2011. – Vol. 29. – P. 487–494.
88. Buttermore, S. T. Increased RHAMM expression relates to ovarian cancer progression / S. T. Buttermore, M. S. Hoffman, A. Kumar [et al.] // *J. Ovarian Res.* – 2017. – Vol. 10, № 1. – P. 66.
89. Cai, J. The role of the PTEN/PI3K/Akt pathway on prognosis in epithelial ovarian cancer: a meta-analysis / J. Cai, L. Xu, H. Tang [et al.] // *Oncologist.* – 2014. – Vol. 19, № 5. – P. 528–535.
90. Cai, L. L. RGD peptide-mediated chitosan-based polymeric micelles targeting delivery for integrin overexpressing tumor cells / L. L. Cai, P. Liu, X. Li [et al.] // *Int. J. Nanomedicine.* – 2011. – Vol. 6. – P. 3499–3508.
91. Campo, G. M. Combined treatment with hyaluronan inhibitor Pep-1 and a selective adenosine A2 receptor agonist reduces inflammation in experimental arthritis / G. M. Campo, A. Avenoso, A. D'Ascola [et al.] // *Innate Immun.* – 2013. – Vol. 19, № 5. – P. 462–478.
92. Campo, G. M. Inhibition of small HA fragment activity and stimulation of A adenosine receptor pathway limit apoptosis and reduce cartilage damage in experimental arthritis / G. M. Campo, A. Micali, A. Avenoso [et al.] // *Histochem. Cell Biol.* – 2015. – Vol. 143, № 5. – P. 531–543.
93. Cantelmo, A. R. Cell delivery of Met docking site peptides inhibit angiogenesis and vascular tumor growth / A. R. Cantelmo, R. Cammarota, D. M. Noonan [et al.] // *Oncogene.* – 2010. – Vol. 29. – P. 5286–5298.
94. Capasso, M. Common variations in BARD1 influence susceptibility to high-risk neuroblastoma / M. Capasso, M. Devoto, C. Hou [et al.] // *Nat. Genet.* – 2009. – Vol. 41. – P. 718–723.
95. Casalegno-Garduno, R. Clinical peptide vaccination trials for leukemia patients / R. Casalegno-Garduno, A. Schmitt, M. Schmitt // *Expert Rev. Vaccines.* – 2011. – Vol. 10, № 6. – P. 785–99.
96. Cerrato, C. P. Novel cell-penetrating peptide targeting mitochondria / C. P. Cerrato, M. Pirisinu, E. N. Vlachos, U. Langel // *FASEB J.* – 2015. – Vol. 29. – P. 4589–4599.

97. Cescato, R. Evaluation of <sup>177</sup>Lu-DOTA-sst2 antagonist versus <sup>177</sup>Lu-DOTA-sst2 agonist binding in human cancers in vitro / R. Cescato, B. Waser, M. Fani, J. C. Reubi // *J. Nucl. Med.* – 2011. – Vol. 52, № 12. – P. 1886–1890.
98. Chapin, S. J. Cellular microtubules heterogeneous in their content of microtubule-associated protein 4 (MAP4) / S. J. Chapin, J. C. Bulinski // *Cell Motil. Cytoskeleton.* – 1994. – Vol. 27, № 2. – P. 133–49.
99. Chau, M. F. The microtubule-associated protein Tau cross-links to two distinct sites on each alpha and beta tubulin monomer via separate domains / M. F. Chau, M. J. Radeke, C. de Ines [et al.] // *Biochemistry.* – 1998. – Vol. 37, № 51. – P. 17692–17703.
100. Chavakis, T. Regulation of neovascularization by human neutrophil peptides (alpha-defensins): a link between inflammation and angiogenesis / T. Chavakis, D. B. Cines, J. S. Rhee [et al.] // *FASEB. J.* – 2004. – Vol. 18. – P. 1306–1308.
101. Chen, H. The non-motor adaptor HMMR dampens Eg5-mediated forces to preserve the kinetics and integrity of chromosome segregation / H. Chen, M. Connell, L. Mei [et al.] // *Mol. Biol. Cell.* – 2018. – Vol. 29. – P. 786–796.
102. Chen, H. Spatial regulation of Aurora A activity during mitotic spindle assembly requires RHAMM to correctly localize TPX2 / H. Chen, P. Mohan, J. Jiang [et al.] // *Cell Cycle.* – 2014. – Vol. 13. – P. 2248–2261.
103. Chen, H. M. Effects of the anti-bacterial peptide cecropin B and its analogs, cecropins B-1 and B-2, on liposomes, bacteria, and cancer cells / H. M. Chen, W. Wang, D. Smith, S. C. Chan // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1997. – Vol. 1336. – P. 171–179.
104. Chen, J. Folic acid and cell-penetrating peptide conjugated PLGA-PEG bifunctional nanoparticles for vincristine sulfate delivery / J. Chen, S. Li, Q. Shen // *Eur. J. Pharm. Sci.* – 2012. – Vol. 47. – P. 430–443.
105. Chen, Y. T. Immunohistochemical analysis of RHAMM expression in normal and neoplastic human tissues: a cell cycle protein with distinctive expression in mitotic cells and testicular germ cells / Y. T. Chen, Z. Chen, Y. N. Du // *Oncotarget.* – 2018. – Vol. 9, № 30. – P. 20941–20952.
106. Chen, Z. A neurosteroid analogue photolabeling reagent labels the colchicines-binding site on tubulin: a mass spectrometric analysis / Z. Chen, L. H. Chen, N. Akentieva [et al.] // *Electrophoresis.* – 2012. – Vol. 33, № 4. – P. 666–674.
107. Chernysh, S. Antiviral and antitumor peptides from insects / S. Chernysh, S. I. Kim, G. Bekker [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2002. – Vol. 99. – P. 12628–12632.
108. Chi, A. Molecular characterization of kidney cancer: association of hyaluronic acid family with histological subtypes and metastasis / A. Chi, S. P. Shirodkar, D. O. Escudero [et al.] // *Cancer.* – 2012. – Vol. 118, № 9. – P. 2394–402.
109. Chmielik, E. Heterogeneity of thyroid cancer / E. Chmielik, D. Rusinek, M. Oczko-Wojciechowska [et al.] // *Pathobiology.* – 2018. – Vol. 85, № 1-2. – P. 117–129.
110. Choi, S. Function and clinical relevance of RHAMM isoforms in pancreatic tumor progression / S. Choi, D. Wang, X. Chen [et al.] // *Mol. Cancer.* – 2019. – Vol. 18, № 1. – P. 92.
111. Cho, J. J. Solution structure of BID, an intracellular amplifier of apoptotic signaling / J. J. Chou, H. Li, G. S. Salvesen [et al.] // *Cell.* – 1999. – Vol. 96. – P. 615–624.
112. Chu, T. L. H. Cell cycle-dependent tumor engraftment and migration are enabled by aurora-A / T. L. H. Chu, M. Connell, L. Zhou [et al.] // *Mol. Cancer Res.* – 2018. – Vol. 16. – P. 16–31.
113. Clark, E. S. A new role for cortactin in invadopodia: regulation of protease secretion / E. S. Clark, A. M. Weaver // *Eur. J. Cell Biol.* – 2008. – Vol. 87. – P. 581–590.
114. Cole, A. M. Isolation and characterization of pleurocidin, an antimicrobial peptide in the skin secretions of winter flounder / A. M. Cole, P. Weis, G. Diamond // *J. Biol. Chem.* – 1997. – Vol. 272. – P. 12008–12013.
115. Condeelis, J. Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis / J. Condeelis, J. W. Pollard // *Cell.* – 2006. – Vol. 124. – P. 263–6.

116. Coriat, R. Pharmacokinetics and safety of DTS-108, a human oligopeptide bound to SN-38 with anesterase-sensitive cross-linker in patients with advanced malignancies: a Phase I study / R. Coriat, S. J. Faivre, O. Mir [et al.] // *Int. J. Nanomed.* – 2016. – Vol. 11. – P. 6207–6216.
117. Cortes-Dericks, L. CD44 and its ligand hyaluronan as potential biomarkers in malignant pleural mesothelioma: evidence and perspectives / L. Cortes-Dericks, R. A. Schmid // *Respir. Res.* – 2017. – Vol. 18. – P. 58.
118. Corti, A. The neovasculature homing motif NGR: more than meets the eye / A. Corti, F. Curnis, W. Arap, R. Pasqualini // *Blood.* – 2008. – Vol. 112. – P. 2628–2635.
119. Cory, S. Apoptosis. Fascinating death factor / S. Cory // *Nature.* – 1994. – Vol. 367, № 6461. – P. 317–318.
120. Coussens, L. M. Inflammation and cancer / L. M. Coussens, Z. Werb // *Nature.* – 2002. – Vol. 420. – P. 860–867.
121. Cruciani, R. A. Antibiotic magainins exert cytolytic activity against transformed cell lines through channel formation / R. A. Cruciani, J. L. Barker, M. Zasloff [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1991. – Vol. 88. – P. 3792–3796.
122. Csoka, A. B. Hypotheses on the evolution of hyaluronan: a highly ironic acid / A. B. Csoka, R. Stern // *Glycobiology.* – 2013. – Vol. 23. – P. 398–411.
123. Cyphert, J. M. Size matters: molecular weight specificity of hyaluronan effects in cell biology / J. M. Cyphert, C. S. Trempus, S. Garantziotis // *Int. J. Cell Biol.* – 2015. – Vol. 2015. – P. 563818.
124. Dagogo-Jack, I. Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies / I. Dagogo-Jack, A. T. Shaw // *Nat. Rev. Clin. Oncol.* – 2018 – Vol. 15, № 2. – P. 81–94.
125. Dalm, S. U. Review: Receptor targeted nuclear imaging of breast cancer / S. U. Dalm, J. F. Verzijlbergen, M. De Jong // *Int. J. Mol. Sci.* – 2017. – Vol. 18, № 2. – P. pii: E260.
126. Daniels, M. J. Unconventional pathways of secretion contribute to inflammation / M. J. Daniels, D. Brough // *Int. J. Mol. Sci.* – 2017. – Vol. 18, № 1. – P. 102.
127. Dasgupta, P. N-terminal acylation of somatostatin analog with long chain fatty acids enhances its stability and anti-proliferative activity in human breast adenocarcinoma cells / P. Dasgupta, A. Singh, R. Mukherjee // *Biol. Pharm. Bull.* – 2002. – Vol. 25, № 1. – P. 29–36.
128. Davies, J. S. The cyclization of peptides and depsipeptides / J. S. Davies // *J. Peptide Sci.* – 2003. – Vol. 9, № 8. – P. 471–501.
129. Dawidczyk, C. M. Recommendations for benchmarking preclinical studies of nanomedicines / C. M. Dawidczyk, L. M. Russell, P. C. Searson // *Cancer Res.* – 2015. – Vol. 75. – P. 4016–4020.
130. Day, A. J. Hyaluronan-binding proteins: tying up the giant / A. J. Day, G. D. Prestwich // *J. Biol. Chem.* – 2002. – Vol. 277, № 7. – P. 4585–4588.
131. Day, C. L. Structure of the BH3 domains from the p53-inducible BH3-only proteins Noxa and Puma in complex with Mcl-1 / C. L. Day, C. Smits, F. C. Fan [et al.] // *J. Mol. Biol.* – 2008. – Vol. 380, № 5. – P. 958–971.
132. De Coupade, C. Novel human-derived cell-penetrating peptides for specific subcellular delivery of therapeutic biomolecules / C. De Coupade, A. Fittipaldi, V. Chagnas [et al.] // *Biochem. J.* – 2005. – Vol. 390. – P. 407–418.
133. De Vincentis, G. Role of <sup>99m</sup>Tc-bombesin scan in diagnosis and staging of prostate cancer / G. De Vincentis, S. Remediani, A. D. Varvarigou [et al.] // *Cancer Biother. Radiopharm.* – 2004. – Vol. 19, № 1. – P. 81–84.
134. Del Pozo, E. Endocrine profile of a long-acting somatostatin derivative SMS 201-995. Study in normal volunteers following subcutaneous administration / E. Del Pozo, M. Neufeld, K. Schlüter [et al.] // *Acta Endocrinol. (Copenh).* – 1986. – Vol. 111, № 4. – P. 433–439.
135. Derossi, D. The third helix of the Antennapedia home domain translocates through biological membranes / D. Derossi, A. H. Joliot, G. Chassaing, A. Prochiantz // *J. Biol. Chem.* – 1994. – Vol. 269. – P. 10444–10450.

136. Desai, B. Invadopodia and matrix degradation, a new property of prostate cancer cells during migration and invasion / B. Desai, T. Ma, M. A. Chellaiah // *J. Biol. Chem.* – 2008. – Vol. 283, № 20. – P. 13856–13866.
137. Desgrosellier, J. S. Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities / J. S. Desgrosellier, D. A. Cheresh // *Nat. Rev. Cancer.* – 2010. – Vol. 10. – P. 9–22.
138. Deshayes, S. Structural polymorphism of two CPP: an important parameter of activity / S. Deshayes, M. Decaffmeyer, R. Brasseur, A. Thomas // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2008. – Vol. 1778. – P. 1197–1205.
139. Devred, F. Microtubule and MAPs: thermodynamics of complex formation by AUC, ITC, fluorescence, and NMR / F. Devred, P. Barbier, D. Lafitte [et al.] // *Methods Cell Biol.* – 2010. – Vol. 95. – P. 449–480.
140. Dey, N. Mutation matters in precision medicine: A future to believe in / N. Dey, C. Williams, B. Leyland-Jones, P. De // *Cancer Treat Rev.* – 2017. – Vol. 55. – P. 136–149.
141. Di Martino, J. The microenvironment controls invadosome plasticity / J. Di Martino, E. Henriot, Z. Ezzoukhry [et al.] // *J. Cell Sci.* – 2016. – Vol. 129, № 9. – P. 1759–1768.
142. Diaz, B. Tks5-dependent, nox-mediated generation of reactive oxygen species is necessary for invadopodia formation / B. Diaz, G. Shani, I. Pass [et al.] // *Sci. Signal.* – 2009. – Vol. 2, № 58. – P. ra53.
143. Dicker, K. T. Hyaluronan: a simple polysaccharide with diverse biological functions / K. T. Dicker, L. A. Gurski, S. Pradhan-Bhatt [et al.] // *Acta Biomater.* – 2014. – Vol. 10. – P. 1558–1570.
144. Dinca, A. Intracellular delivery of proteins with cell-penetrating peptides for therapeutic uses in human disease / A. Dinca, W. M. Chien, M. T. Chin // *Int. J. Mol. Sci.* – 2016. – Vol. 17, № 2. – P. 263.
145. Dominguez, R. Actin Structure and Function / R. Dominguez, K. C. Holmes // *Annual Review of Biophysics.* – 2011. – Vol. 40, № 40. – P. 169–186.
146. Dosaka-Akita, H. Bcl-2 expression in non-small cell lung cancers: higher frequency of expression in squamous cell carcinomas with earlier pT status / H. Dosaka-Akita, M. Katabami, H. Hommura [et al.] // *Oncology.* – 1999. – Vol. 56. – P. 259–264.
147. Downing, K. H. Crystallographic structure of tubulin: implications for dynamics and drug binding / K. H. Downing, E. Nogales // *Cell Struct. Funct.* – 1999. – Vol. 24. – P. 269–275.
148. Droin, N. Human defensins as cancer biomarkers and antitumour molecules / N. Droin, J. B. Hendra, P. Ducoroy, E. Solary // *J. Proteomics.* – 2009. – Vol. 72. – P. 918–927.
149. Drummen, G. P. C. Fluorescent probes and fluorescence (microscopy) techniques-illuminating biological and biomedical research / G. P. C. Drummen // *Molecules.* – 2012. – Vol. 17. – P. 14067–14090.
150. Du, Y. C. Receptor for hyaluronan-mediated motility isoform B promotes liver metastasis in a mouse model of multistep tumorigenesis and a tail vein assay for metastasis / Y. C. Du, C. K. Chou, D. S. Klimstra, H. Varmus // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2011. – Vol. 108, № 40. – P. 16753–16755.
151. Du, Y. C. Assessing tumor progression factors by somatic gene transfer into a mouse model: Bcl-xL promotes islet tumor cell invasion / Y. C. Du, B. C. Lewis, D. Hanahan, H. Varmus // *PLoS Biol.* – 2007. – Vol. 5. – P. e276.
152. Duan, Y. Targeting tubulin-colchicine site for cancer therapy: inhibitors, antibody-drug conjugates and degradation agents / Y. Duan, W. Liu, L. Tian [et al.] // *Curr. Top Med. Chem.* – 2019. – Vol. 19, № 15. – P. 1289–1304.
153. Dubikovskaya, E. A. Overcoming multidrug resistance of small-molecule therapeutics through conjugation with releasable octa arginine transporters / E. A. Dubikovskaya, S. H. Thorne, T. H. Pillow [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2008. – Vol. 105. – P. 12128–12133.
154. Dunsch, A. K. Dynein light chain 1 and spindle-associated adaptor promote dynein asymmetry and spindle orientation / A. K. Dunsch, D. Hammond, J. Loyd [et al.] // *J. Cell Biol.* – 2012. – Vol. 198. – P. 1039–1054.

155. Duvall, E. Death and the cell / E. Duvall, A. H. Wyllie // *Immunol. Today*. – 1986. – Vol. 7, № 4. – P. 115–119.
156. Eberle, A. N. MSH radiopeptides for targeting melanoma metastases / A. N. Eberle, J. P. Bapst, M. Calame [et al.] // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2010. – Vol. 681. – P. 133–142.
157. Efremov, R. G. The architecture of respiratory complex I / R. G. Efremov, R. Baradaran, L. A. Sazanov // *Nature*. – 2010. – Vol. 465, № 7297. – P. 441–445.
158. Eibes, S. Nek9 phosphorylation defines a new role for TPX2 in Eg5-dependent centrosome separation before nuclear envelope breakdown / S. Eibes, N. Gallisa-Sune, M. Rosas-Salvans [et al.] // *Curr. Biol.* – 2018. – Vol. 28, – P. 121–129.
159. Elayadi, A. N. A peptide selected by biopanning identifies the integrin alpha v beta 6 as a prognostic biomarker for nonsmall cell lung cancer / A. N. Elayadi, K. N. Samli, L. Prudkin [et al.] // *Cancer Res.* – 2007. – Vol. 67. – P. 5889–5895.
160. Enback, J. Tumour-homing peptides: tools for targeting, imaging and destruction / J. Enback, P. Laakkonen // *Biochemical Society Transactions*. – 2007. – Vol. 35, № 4. – P. 780–783.
161. Entwistle, J. HA receptors: regulators of signalling to the cytoskeleton / J. Entwistle, C. L. Hall, E. A. Turley // *J. Cell Biochem.* – 1996. – Vol. 61, № 4. – P. 569–77.
162. Epand, R. F. The apoptotic protein tBid promotes leakage by altering membrane curvature / R. F. Epand, J. C. Martinou, M. Fornallaz-Mulhauser [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2002. – Vol. 277. – P. 32632–32639.
163. Esguerra, K. V. Identification, design and synthesis of tubulin-derived peptides as novel hyaluronan mimetic ligands for the receptor for hyaluronan-mediated motility (RHAMM/HMMR) / K. V. Esguerra, C. Tolg, N. Akentieva [et al.] // *Integr. Biol. (Camb)*. – 2015. – Vol. 7, № 12. – P. 1547–1560.
164. Evanko, S. P. Intracellular hyaluronan in arterial smooth muscle cells: association with microtubules, RHAMM, and the mitotic spindle / S. P. Evanko, W. T. Parks, T. N. Wight // *J. Histochem Cytochem.* – 2004. – Vol. 52, № 12. – P. 1525–1535.
165. Fadnes, B. The anticancer activity of lytic peptides is inhibited by heparan sulfate on the surface of the tumor cells / B. Fadnes, O. Rekdal, L. Uhlin-Hansen // *BMC Cancer*. – 2009. – Vol. 9. – P. 183–193.
166. Farkhani, S. M. Cell penetrating peptides: efficient vectors for delivery of nanoparticles, nanocarriers, therapeutic and diagnostic molecules / S. M. Farkhani, A. Valizadeh, H. Karami [et al.] // *Peptides*. – 2014. – Vol. 57. – P. 78–94.
167. Ferlay, J. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in gLOBOCAN 2012 / J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. Dikshit [et al.] // *Int. J. Cancer*. – 2015. – Vol. 136, № 5. – P. E359–386.
168. Foell, D. Mechanisms of disease: a 'DAMP' view of inflammatory arthritis / D. Foell, H. Wittkowski, J. Roth // *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.* – 2007. – Vol. 3, № 7. – P. 382–390.
169. Foley, J. P. Toll-like receptor 2 (TLR2), transforming growth factor- $\beta$ , hyaluronan (HA), and receptor for HA-mediated motility (RHAMM) are required for surfactant protein A-stimulated macrophage chemotaxis / J. P. Foley, D. Lam, H. Jiang [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2012. – Vol. 287, № 44. – P. 37406–37409.
170. Foster, A. E. Selective elimination of a chemoresistant side population of B-CLL cells by cytotoxic T lymphocytes in subjects receiving an autologous hCD40L/IL-2 tumor vaccine / A. E. Foster, F. V. Okur, E. Biagi [et al.] // *Leukemia*. – 2010. – Vol. 2, № 3. – P. 563–572.
171. Fragkos, M. Mitotic catastrophe occurs in the absence of apoptosis in p53-null cells with a defective G1 checkpoint / M. Fragkos, P. Beard // *PLoS One*. – 2011. – Vol. 6, № 8. – P. e22946.
172. Frankel, A. D. Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus / A. D. Frankel, C. O. Pabo // *Cell*. – 1988. – Vol. 55. – P. 1189–1193.
173. Friedl, P. Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model / P. Friedl, K. Wolf // *J. Cell. Biol.* – 2010. – Vol. 188. – P. 11–19.

174. Fuchs, K. Opposing effects of high- and low-molecular weight hyaluronan on CXCL12-induced CXCR4 signaling depend on CD44 / K. Fuchs, A. Hippe, A. Schmaus [et al.] // *Cell Death Dis.* – 2013. – Vol. 4. – P. e819.

175. Fuertes, G. Role of membrane lipids for the activity of pore forming peptides and proteins / G. Fuertes, D. Gimenez, S. Esteban-Martin [et al.] // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2010. – Vol. 677. – P. 31–55.

176. Fuertes, G. A lipocentric view of peptide-induced pores / G. Fuertes, D. Gimenez, S. Esteban-Martin [et al.] // *Eur. Biophys. J.* – 2011. – Vol. 40. – P. 399–415.

177. Fukui, M. Anti-tumor activity of dendritic cells transfected with mRNA for receptor for hyaluronan-mediated motility is mediated by CD4+ T cells / M. Fukui, K. Ueno, Y. Suehiro [et al.] // *Cancer Immunol. Immunother.* – 2006. – Vol. 55, № 5. – P. 538–546.

178. Fulcher, L. J. FAM83D directs protein kinase CK1alpha to the mitotic spindle for proper spindle positioning / L. J. Fulcher, Z. He, L. Mei [et al.] // *EMBO. Rep.* – 2019. – Vol. 20, № 9. – P. e47495.

179. Gaggar, A. Bioactive extracellular matrix fragments in lung health and disease / A. Gaggar, N. Weathington // *J. Clin. Invest.* – 2016. – Vol. 126. – P. 3176–3184.

180. Gao, F. Hyaluronan oligosaccharides are potential stimulators to angiogenesis via RHAMM mediated signal pathway in wound healing / F. Gao, C. X. Yang, W. Mo [et al.] // *Clin. Invest. Med.* – 2008. – Vol. 31, № 3. – P. E106–E116.

181. Gao, W. The use of electronic-neutral penetrating peptides cyclosporin A to deliver pro-apoptotic peptide: A possibly better choice than positively charged TAT / W. Gao, X. Yang, Z. Lin [et al.] // *J. Control Release.* – 2017. – Vol. 261. – P. 174–186.

182. Garantziotis, S. Hyaluronan biology: A complex balancing act of structure, function, location and context / S. Garantziotis, R. C. Savani // *Matrix Biol.* – 2019. – Vol. 78-79. – P. 1–10.

183. Garcia-Posadas, L. Hyaluronan receptors in the human ocular surface: a descriptive and comparative study of RHAMM and CD44 in tissues, cell lines and freshly collected samples / L. Garcia-Posadas, L. Contreras-Ruiz, A. Lopez-Garcia [et al.] // *Histochem. Cell Biol.* – 2012. – Vol. 137. – P. 165–176.

184. Garrido, G. Non-centrosomal TPX2-dependent regulation of the aurora A kinase: functional implications for healthy and pathological cell division / G. Garrido, I. Vernos // *Front. Oncol.* – 2016. – Vol. 6. – P. 88.

185. Gately, C. L. In vitro studies on the cell-mediated immune response to human brain tumors. II. Leukocyte-induced coats of glycosaminoglycan increase the resistance of glioma cells to cellular immune attack / C. L. Gately, L. M. Muul? M. A. Greenwood [et al.] // *J. Immunol.* – 1984. – Vol. 133, № 6. – P. 3387–3395.

186. Génot, E. Invadosomes in their natural habitat / E. Génot, B. Gligorijevic // *Eur. J. Cell Biol.* – 2014. – Vol. 93, № 10-12. – P. 367–379.

187. Gera, J. F. Human neutrophil peptide defensins induce single strand DNA breaks in target cells / J. F. Gera, A. Lichtenstein // *Cell Immunol.* – 1991. – Vol. 138. – P. 108–120.

188. Giannopoulos, K. Peptide vaccination elicits leukemia-associated antigen-specific cytotoxic CD8+ T-cell responses in patients with chronic lymphocytic leukemia / K. Giannopoulos, A. Dmoszynska, M. Kowal [et al.] // *Leukemia.* – 2010. – Vol. 24. – P. 798–805.

189. Giannopoulos, K. The candidate immune therapeutical target, the receptor for hyaluronic acid-mediated motility, is associated with proliferation and shows prognostic value in B-cell chronic lymphocytic leukemia / K. Giannopoulos, D. Mertens, A. Bühler [et al.] // *Leukemia.* – 2009. – Vol. 23. – P. 519–527.

190. Gilbert, M. R. Cilengitide in patients with recurrent glioblastoma: the results of NABTC 03–02, a phase II trial with measures of treatment delivery / M. R. Gilbert, J. Kuhn, K. R. Lamborn [et al.] // *J. Neurooncol.* – 2012. – Vol. 106. – P. 147–153.

191. Gordeeva, A. V. Apoptosis of unicellular organisms: mechanisms and evolution / A. V. Gordeeva, Yu. A. Labas, R. A. Zvyagilskaya // *Biochemistry.* – 2004. – Vol. 69, № 10. – P. 1301–13.

192. Gorovits, B. Proposed mechanism of off-target toxicity for antibody-drug conjugates driven by mannose receptor uptake / B. Gorovits, C. Krinos-Fiorotti // *Cancer Immunol. Immunother.* – 2013. – Vol. 2. – P. 217–223.
193. Goueffic, Y. Hyaluronan induces vascular smooth muscle cell migration through RHAMM-mediated PI3K-dependent Rac activation / Y. Goueffic, C. Guilluy, P. Guerin [et al.] // *Cardiovasc. Res.* – 2006. – Vol. 72. – P. 339–348.
194. Green, M. Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat trans-activator protein / M. Green, P. M. Loewenstein // *Cell.* – 1988. – Vol. 55. – P. 1179–1188.
195. Greiner, J. Receptor for hyaluronan acid-mediated motility (RHAMM) is a new immunogenic leukemia-associated antigen in acute and chronic myeloid leukemia / J. Greiner, M. Ringhoffer, M. Taniguchi [et al.] // *Exp. Hematol.* – 2002. – Vol. 30. – P. 1029–1035.
196. Greiner, J. High-dose RHAMM-R3 peptide vaccination for patients with acute myeloidleukemia, myelodysplastic syndrome and multiple myeloma / J. Greiner, A. Schmitt, K. Giannopoulos [et al.] // *Haematologica.* – 2010. – Vol. 95, № 7. – P. 1191–1197.
197. Groen, A. C. XRHAMM functions in ran-dependent microtubule nucleation and pole formation during anastral spindle assembly / A. C. Groen, L. A. Cameron, M. Coughlin [et al.] // *Curr. Biol.* – 2004. – Vol. 14, № 20. – P. 1801–1811.
198. Guidotti, G. Cell-penetrating peptides: from basic research to clinics / G. Guidotti, L. Brambilla, D. Rossi // *Trends. Pharmacol. Sci.* – 2017. – Vol. 38. – P. 406–424.
199. Gül, G. A comprehensive review of denosumab for bone metastasis in patients with solid tumors / G. Gül, M. A. Sendur, S. Aksoy [et al.] // *Curr. Med. Res. Opin.* – 2016. – Vol. 32, № 1. – P. 133–45.
200. Guldbrandsen, K. F. Nuclear molecular imaging strategies in immune checkpoint inhibitor therapy / K. F. Guldbrandsen, H. W. Hendel, S. W. Langer, B. M. Fischer // *Diagnostics (Basel).* – 2017. – Vol. 7, № 2. – pii: E23.
201. Gurski, L. A. Hyaluronan (HA) interacting proteins RHAMM and hyaluronidase impact prostate cancer cell behavior and invadopodia formation in 3D HA-based hydrogels / L. A. Gurski, X. Xu, L. N. Labrada [et al.] // *Plos One.* – 2012. – Vol. 7, № 11. – P. e50075.
202. Gust, K. M. RHAMM (CD168) is overexpressed at the protein level and may constitute an immunogenic antigen in advanced prostate cancer disease / K. M. Gust, M. D. Hofer, S. R. Perner [et al.] // *Neoplasia.* – 2009. – Vol. 11, № 9. – P. 956–63.
203. Hall, C. L. Pp60(c-src) is required for cell locomotion regulated by the hyaluronan receptor RHAMM / C. L. Hall, L. A. Lange, D. A. Prober [et al.] // *Oncogene.* – 1996. – Vol. 13. – P. 2213–22246.
204. Hall, C. L. Hyaluronan and the hyaluronan receptor RHAMM promote focal adhesion turnover and transient tyrosine kinase activity / C. L. Hall, C. Wang, L. A. Lange, E. A. Turley // *J. Cell Biol.* – 1994. – Vol. 126. – P. 575–588.
205. Hall, C. L. Overexpression of the hyaluronan receptor RHAMM is transforming and is also required for H-ras transformation / C. L. Hall, B. Yang, X. Yang [et al.] // *Cell.* – 1995. – Vol. 82, № 1. – P. 19–26.
206. Hambley, T. W. Is anticancer drug development heading in the right direction? T. W. Hambley, W. N. Hait // *Cancer Res.* – 2009. – Vol. 69. – P. 1259–1262.
207. Hamilton, S. R. The hyaluronan receptors CD44 and Rhamm (CD168) form complexes with ERK1,2 that sustain high basal motility in breast cancer cells / S. R. Hamilton, S. F. Fard, F. F. Paiwand [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2007. – Vol. 282, № 22. – P. 16667–16680.
208. Hancock, R. E. Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials / R. E. Hancock // *Lancet Infect. Dis.* – 2001. – Vol. 1, № 3. – P. 156–164.
209. Hardwick, C. Molecular cloning of a novel hyaluronan receptor that mediates tumor cell motility / C. Hardwick, K. Hoare, R. Owens [et al.] // *J. Cell Biol.* – 1992. – Vol. 117. – P. 1343–1350.
210. Hatano, H. RHAMM/ERK interaction induces proliferative activities of cementifying fibroma cells through a mechanism based on the CD44-EGFR / H. Hatano, H. Shigeishi, Y. Kudo [et al.] // *Lab. Invest.* – 2011. – Vol. 91, № 3. – P. 379–391.

211. Hatano, H. Overexpression of receptor for hyaluronan-mediated motility (RHAMM) in MC3T3-E1 cells induces proliferation and differentiation through phosphorylation of ERK1/2 / H. Hatano, H. Shigeishi, Y. Kudo. [et al.] // *J. Bone Miner. Metab.* – 2012. – Vol. 30, № 3. – P. 293–303.
212. Hauser-Kawaguchi, A. Design of peptide mimetics to block pro-inflammatory functions of HA fragments / A. Hauser-Kawaguchi, L. G. Luyt, E. Turley // *Matrix Biol.* – 2019. – Vol. 78-79. – P. 346–356.
213. Hauser-Kawaguchi, A. A truncated RHAMM protein for discovering novel therapeutic peptides A. / Hauser-Kawaguchi, C. Tolg, T. Peart [et al.] // *Bioorg. Med. Chem.* – 2018. – Vol. 26 (18). – P. 5194–5203.
214. He, Z. Hyaluronan mediated motility Receptor (HMMR) encodes an evolutionarily conserved homeostasis, mitosis, and meiosis regulator rather than a hyaluronan receptor / Z. He, L. Mei, M. Connell, C. A. Maxwell // *Cells.* – 2020. – Vol. 9, № 4. – pii: E819.
215. Heitz, F. Twenty years of cell-penetrating peptides: from molecular mechanisms to therapeutics / F. Heitz, M. C. Morris, G. Divita // *Br. J. Pharmacol.* – 2009. – Vol. 157. – P. 195–206.
216. Heldin, C. H. High interstitial fluid pressure – an obstacle in cancer therapy / C. H. Heldin, K. Rubin, K. Pietras, A. Ostman // *Nat. Rev. Cancer.* – 2004. – Vol. 4. – P. 806–813.
217. Heldin, P. Deregulation of hyaluronan synthesis, degradation and binding promotes breast cancer / P. Heldin, K. Basu, B. Olofsson [et al.] // *J. Biochem.* – 2013. – Vol. 154, № 5. – P. 395–408.
218. Heldin, P. HAS2 and CD44 in breast tumorigenesis / P. Heldin, K. Basu, I. Kozlova, H. Porsch // *Adv. Cancer Res.* – 2014. – Vol. 123. – P. 211–229.
219. Higashiyama, M. High prevalence of bcl-2 oncoprotein expression in small cell lung cancer / M. Higashiyama, O. Doi, K. Kodama [et al.] // *Anticancer Res.* – 1995. – Vol. 15. – P. 503–505.
220. Hilchie, A. L. Pleurocidin-family cationic antimicrobial peptides are cytolytic for breast carcinoma cells and prevent growth of tumor xenografts / A. L. Hilchie, C. D. Doucette, D. M. Pinto [et al.] // *Breast Cancer Res.* – 2011. – Vol. 13. – P. R102.
221. Hofmann, M. Problems with RHAMM: A new link between surface adhesion and oncogenesis? / M. Hofmann, V. Assmann, C. Fieber [et al.] // *Cell.* – 1998. – V. 95. – P. 591–592.
222. Holmes, M. W. A. Hyaluronic acid in human articular cartilage. Age-related changes in content and size / M. W. A. Holmes, M. T. Bayliss, H. Muir // *Biochem. J.* – 1988. – Vol. 250. – P. 435–441.
223. Horton, K. L. Mitochondria-penetrating peptides / K. L. Horton, K. M. Stewart, S. B. Fonseca [et al.] // *Chem. Biol.* – 2008. – Vol. 15. – P. 375–382.
224. Hoskin, D. W. Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides / D. W. Hoskin, A. Ramamoorthy // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2008. – Vol. 1778. – P. 357–375.
225. How, K. N. Hyaluronic acid-mediated drug delivery system targeting for inflammatory skin diseases: a mini review / K. N. How, W. H. Yap, C. L. H. Lim [et al.] // *Front. Pharmacol.* – 2020. – Vol. 11. – P. 1105.
226. Hui, L. The combined effects of antibacterial peptide cecropin A and anti-cancer agents on leukemia cells / L. Hui, K. Leung, H. M. Chen // *Anticancer Res.* – 2002. – Vol. 22. – P. 2811–2816.
227. Ijaz, M. The role of Grb2 in cancer and peptides as Grb2 antagonists / M. Ijaz, F. Wang, M. Shahbaz [et al.] // *Protein Pept. Lett.* – 2018. – Vol. 24, № 12. – P. 1084–1095.
228. Inclán, Y. F. Structural models for the self-assembly and microtubule interactions of gamma-, delta- and epsilon-tubulin / Y. F. Inclán, E. Nogales // *J. Cell Sci.* – 2001. – Vol. 114, № Pt 2. – P. 413–22.
229. Itano, N. Altered hyaluronan biosynthesis in cancer progression / N. Itano, K. Kimata // *Semin. Cancer. Biol.* – 2008. – Vol. 18. – P. 268–74.
230. Itano, N. Impact of the hyaluronan-rich tumor microenvironment on cancer initiation and progression / N. Itano, L. Zhuo, K. Kimata // *Cancer Sci.* – 2008. – Vol. 99. – P. 1720–5.
231. Jacobetz, M. A. Hyaluronan impairs vascular function and drug delivery in a mouse model of pancreatic cancer / M. A. Jacobetz, D. S. Chan, A. Neesse [et al.] // *Gut.* – 2013. – Vol. 62. – P. 112–120.

232. Jain, R. K. Transport of molecules, particles and cells in solid tumors / R. K. Jain // *Annu. Rev. Biomed. Eng.* – 1999. – Vol. 1. – P. 241–263.
233. James, M. L. A molecular imaging primer: modalities, imaging agents, and applications // *Physiol. Rev.* – 2012. – Vol. 92. – P. 897–965.
234. Jean, S. R. Peptide-Mediated Delivery of Chemical Probes and Therapeutics to Mitochondria / S. R. Jean, M. Ahmed, E. K. Lei [et al.] P // *Acc. Chem. Res.* – 2016. – Vol. 49, № 9. – P. 1893–1902.
235. Jia, L. Preclinical pharmacokinetics, metabolism, and toxicity of azurin-p28 (NSC745104) a peptide inhibitor of p53 ubiquitination / L. Jia, G. S. Gorman, L. U. Coward [et al.] // *Cancer Chemother. Pharmacol.* – 2011. – Vol. 68. – P. 513–524.
236. Jiang, D. Hyaluronan as an immune regulator in human diseases / D. Jiang, J. Liang, P. W. Noble // *Physiol. Rev.* – 2011. – Vol. 91. – P. 221–264.
237. Jiang, J. Multifunctional proteins bridge mitosis with motility and cancer with inflammation and arthritis / J. Jiang, R. Casalegno-Garduno, H. Chen [et al.] // *Scientific World Journal.* – 2010. – Vol. 10. – P. 1244–1257.
238. Jiang, X. Self-aggregated pegylated poly (trimethylene carbonate) nanoparticles decorated with c(RGDyK) peptide for targeted paclitaxel delivery to integrin-rich tumors / X. Jiang, X. Sha, H. Xin [et al.] // *Biomaterials.* – 2011. – Vol. 32. – P. 9457–9469.
239. Joliot, A. Antennapedia homeobox peptide regulates neural morphogenesis / A. Joliot, C. Pernelle, H. Deagostini-Bazin, A. Prochiantz // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1991. – Vol. 88. – P. 1864–1868.
240. Jordan, A. R. Antitumor activity of sulfated hyaluronic acid fragments in pre-clinical models of bladder cancer / A. R. Jordan, S. D. Lokeshwar, L. E. Lopez [et al.] // *Oncotarget.* – 2017. – Vol. 8, № 15. – P. 24262–24274.
241. Joukov, V. The BRCA1/BARD1 heterodimer modulates ran-dependent mitotic spindle assembly / V. Joukov, A. C. Groen, T. Prokhorova [et al.] // *Cell.* – 2006. – Vol. 27, № 3. – P. 539–552.
242. Juloori, A. Evolving paradigm of radiotherapy for high-risk prostate cancer: current consensus and continuing controversies / A. Juloori, C. Shah, K. Stephans [et al.] // *Prostate Cancer.* – 2016. – Vol. 2016. – P. 2420786.
243. Kagan, B. L. Antimicrobial defensin peptides form voltage-dependent ion-permeable channels in planar lipid bilayer membranes / B. L. Kagan, M. E. Selsted, T. Ganz, R. I. Lehrer // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1990. – Vol. 87. – P. 210–214.
244. Kakde, D. Cancer therapeutics – opportunities, challenges and advances in drug delivery / D. Kakde, D. Jain, V. Shrivastava [et al.] // *J. Appl. Pharm. Science.* – 2011. – Vol. 1, № 9. – P. 1–10.
245. Kale, A. A. “Smart” drug carriers: PEGylated TATp-modified pH-sensitive liposomes / A. A. Kale, V. P. Torchilin // *J. Liposome Res.* – 2007. – Vol. 17. – P. 197–203.
246. Kalyanaraman, B. Doxorubicin-induced apoptosis: implications in cardiotoxicity / B. Kalyanaraman, J. Joseph, S. Kalivendi [et al.] // *Mol. Cell Biochem.* – 2002. – Vol. 234–235, № 1-2. – P. 119–124.
247. Karamitopoulou, E. Systematic assessment of protein phenotypes characterizing high-grade tumour budding in mismatch repair-proficient colorectal cancer / E. Karamitopoulou, A. Lugli, I. [et al.] Panayiotides // *Histopathology.* – 2010. – Vol. 57. – P. 233–243.
248. Kardani, K. Cell penetrating peptides: the potent multi-cargo intracellular carriers / K. Kardani, A. Milani, H. S. Shabani, A. Bolhassani // *Expert. Opin. Drug Deliv.* – 2019. – Vol. 16, № 11. – P. 1227–1258.
249. Kato, N. Alternate mucoid and hyalinized stroma in clear cell carcinoma of the ovary: manifestation of serial stromal remodeling / N. Kato, J. Takeda, M. Fukase, T. Motoyama // *Mod. Pathol.* – 2010. – Vol. 23, № 6. – P. 881–888.
250. Katz, B. Z. Adhesion molecules-the lifelines of multiple myeloma cells / B. Z. Katz // *Semin. Cancer Biol.* – 2010. – Vol. 20, № 3. – P. 186–195.

251. Kellett-Clarke, H. CD44 Binding to Hyaluronic Acid Is Redox Regulated by a Labile Disulfide Bond in the Hyaluronic Acid Binding Site / H. Kellett-Clarke, M. Stegmann, A. N. Barclay, C. Metcalfe // *PLOS ONE*. – 2015. – P. 1–18.

252. Khaw, S. L. Overcoming blocks in apoptosis with BH3-mimetic therapy in hematological malignancies / S. L. Khaw, D. C. Huang, A. W. Roberts // *Pathology*. – 2011. – Vol. 43. – P. 525–535.

253. Khurana, S. S. The hyaluronic acid receptor CD44 coordinates normal and metaplastic gastric epithelial progenitor cell proliferation / S. S. Khurana, T. E. Riehl, B. D. Moore [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2013. – Vol. 288, № 22. – P. 16085–16097.

254. Kim, I. W. Effects of the synthetic coprisin analog peptide, CopA3 in pathogenic microorganisms and mammalian cancer cells / I. W. Kim, S. J. Kim, Y. N. Kwon [et al.] // *J. Microbiol. Biotechnol.* – 2012. – Vol. 22. – P. 156–158.

255. Kimura, N. Cellular and molecular events during oocyte maturation in mammals: molecules of cumulus-oocyte complex matrix and signalling pathways regulating meiotic progression / N. Kimura, Y. Hoshino, K. Totsukawa, E. Sato // *Soc. Reprod Fertil Suppl.* – 2007. – Vol. 63. – P. 327–342.

256. Kobus, T. Safety validation of repeated blood-brain barrier disruption using focused ultrasound / T. Kobus, N. Vykhodtseva, M. Pilatou [et al.] // *Ultrasound. Biol.* – 2016. – Vol. 42, № 2. – P. 481–492.

257. Kobus, T. Growth inhibition in a brain metastasis model by antibody delivery using focused ultrasound-mediated blood-brain barrier disruption / T. Kobus, I. K. Zervantonakis, Y. Zhang, N. J. McDannold // *J. Control Release.* – 2016. – Vol. 238. – P. 281–288.

258. Koczulla, A. R. Antimicrobial peptides: current status and therapeutic potential / A. R. Koczulla, R. Bals // *Drugs*. – 2003. – Vol. 63 (4). – P. 389–406.

259. Koelzer, V. H. Expression of the hyaluronan-mediated motility receptor RHAMM in tumor budding cells identifies aggressive colorectal cancers / V. H. Koelzer, B. Huber, V. Mele [et al.] // *Hum. Pathol.* – 2015. – Vol. 46, № 11. – P. 1573–1581.

260. Kolapalli, S. P. Detection of a specific pattern of hyaluronan oligosaccharides and their binding proteins in human ovarian tumour / S. P. Kolapalli, V. A. Thomas [et al.] // *Cell Biochem. Funct.* – 2016. – Vol. 34. – P. 217–225.

261. Konopleva, M. Mechanisms of apoptosis sensitivity and resistance to the BH3 mimetic ABT-737 in acute myeloid leukemia / M. Konopleva, R. Contractor, T. Tsao [et al.] // *Cancer Cell.* – 2006. – Vol. 10. – P. 375–388.

262. Koo, K. C. Prognostic impacts of metastatic site and pain on progression to castrate resistance and mortality in patients with metastatic prostate cancer / K. C. Koo, S. U. Park, K. H. Kim [et al.] // *Yonsei Med. J.* – 2015. – Vol. 56, № 5. – P. 1206–1212.

263. Koren, E. Multifunctional PEGylated 2C5-immunoliposomes containing pH-sensitive bonds and TAT peptide for enhanced tumor cell internalization and cytotoxicity / E. Koren, A. Apte, A. Jani, V. P. Torchilin // *J. Control Release.* – 2012. – Vol. 160, № 2. – P. 264–273.

264. Korkes, F. Hyaluronan-mediated motility receptor (RHAMM) immunohistochemical expression and androgen deprivation in normal peritumoral, hyperplastic and neoplastic prostate tissue / F. Korkes, M. G. de Castro, S. de Cassio Zequi [et al.] // *BJU Int.* – 2014. – Vol. 113, № 5. – P. 822–829.

265. Kouvidi, K. Role of receptor for hyaluronic acid-mediated motility (RHAMM) in low molecular weight hyaluronan (LMWHA)-mediated fibrosarcoma cell adhesion / K. Kouvidi, A. Berdiaki, D. Nikitovic [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2011. – Vol. 286, № 44. – P. 38509–38520.

266. Kouvidi, K. Receptor for hyaluronic acid-mediated motility (RHAMM) regulates HT1080 fibrosarcoma cell proliferation via a  $\beta$ -catenin/c-myc signaling axis / K. Kouvidi, A. Berdiaki, M. Tzardi [et al.] // *Biochim Biophys Acta.* – 2016. – Vol. 1860, № 4. – P. 814–824.

267. Kouvidi, K. Hyaluronan/RHAMM interactions in mesenchymal tumor pathogenesis: role of growth factors / K. Kouvidi, D. Nikitovic, A. Berdiaki, G. N. Tzanakakis // *Adv. Cancer Res.* – 2014. – Vol. 12. – P. 319–49.

268. Koyama, H. Hyper production of hyaluronan in neu-induced mammary tumor accelerates angiogenesis through stromal cell recruitment: possible involvement of versican/PG-M / H. Koyama, T. Hibi, Z. Isogai [et al.] // *Am. J. Pathol.* – 2007. – Vol. 170, № 3. – P. 1086–1099.

269. Krasieński, R. Hyaluronan-mediated regulation of inflammation / R. Krasieński, H. Tchorzewski // *Postepy Hig. Med. Dosw.* – 2007. – Vol. 61. – P. 683–689.
270. Krętownski, R. Efficient apoptosis and necrosis induction by proteasome inhibitor: bortezomib in the DLD-1 human colon cancer cell line / R. Krętownski, A. Stypułkowska, M. Cechowska-Pasko // *Mol Cell Biochem.* – 2015. – Vol. 398, № 1-2. – P. 165–73.
271. Kritzer, J. A. Beta-peptides as inhibitors of protein-protein interactions / J. A. Kritzer, O. M. Stephens, D. A. Guarracino [et al.] // *Bioorg. Med. Chem.* – 2005. – Vol. 13, № 1. – P. 11–16.
272. Kuai, R. Targeted delivery of cargoes into a murine solid tumor by a cell-penetrating peptide and cleavable poly (ethylene glycol) co-modified liposomal delivery system via systemic administration / R. Kuai, W. Yuan, W. Li, Y. Qin [et al.] // *Mol. Pharm.* – 2011. – Vol. 8. – P. 2151–2161.
273. Kulaeva, O. A. Plant defensins: biological role, mechanism, and analysis methods / O. A. Kulaeva, M. S. Klyukova, M. N. Rise [et al.] // *Agricultural Biology.* – 2017. – Vol. 52, № 1. – P. 3–12.
274. Kultti, A. 4-methylumbelliferone inhibits hyaluronan synthesis by depletion of cellular UDP-glucuronic acid and down regulation of hyaluronan synthase 2 and 3 / A. Kultti, S. Pasonen-Seppanen, M. Jauhiainen [et al.] // *Exp. Cell Res.* – 2009. – Vol. 315, № 11. – P. 1914–1923.
275. Kurtzman, S. H. Cytokines in human breast cancer: IL-1alpha and IL-1beta expression / S. H. Kurtzman, K. H. Anderson, Y. Wang [et al.] // *Oncol. Rep.* – 1999. – Vol. 6. – P. 65–70.
276. Kutsuzawa, K. Disrupting actin filaments promotes efficient transfection of a leukemia cell line using cell adhesive protein-embedded carbonate apatite particles / K. Kutsuzawa, S. Tada, S. Hossain [et al.] // *Analytical Biochemistry.* – 2009. – Vol. 388. – P. 164–166.
277. Kyykallio, H. The density and length of filopodia associate with the activity of hyaluronan synthesis in tumor cells / H. Kyykallio, S. Oikari, M. Bueno Álvarez [et al.] // *Cancers (Basel).* – 2020. – Vol. 12, № 7. – P. 1908.
278. Laakkonen, P. Homing peptides as targeted delivery vehicles / P. Laakkonen, K. Vuorinen // *Integr. Biol. (Camb).* – 2010. – Vol. 2, № 7-8. – P. 326–237.
279. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / U. K. Laemmli // *Nature.* – 1970. – Vol. 227. – P. 680–685.
280. Lamberto, I. Development and structural analysis of a nanomolar cyclic peptide antagonist for the EphA4 receptor / I. Lamberto, B. C. Lechtenberg, E. Olson [et al.] // *ACS Chem. Biol.* – 2014. – Vol. 9. – P. 2787–2795.
281. Larimer, B. M. Granzyme B PET imaging as a predictive biomarker of immunotherapy response / B. M. Larimer, E. Wehrenberg-Klee, F. Dubois [et al.] // *Cancer Res.* – 2017. – Vol. 77, № 9. – P. 2318–2327.
282. Leber, B. Still embedded together binding to membranes regulates Bcl-2 protein interactions / B. Leber, J. Lin, D. W. Andrews // *Oncogene.* – 2010. – Vol. 29. – P. 5221–5230.
283. Lee, J. H. Bacteriophage hyaluronidase effectively inhibits growth, migration and invasion by disrupting hyaluronan-mediated Erk1/2 activation and RhoA expression in human breast carcinoma cells / J. H. Lee, L. D. Moore, S. Kumar [et al.] // *Cancer Lett.* – 2010. – Vol. 298. – P. 238–249.
284. Lee, J. Y. Cell-penetrating chitosan /doxorubicin / TAT conjugates for efficient cancer therapy / J. Y. Lee, Y. S. Choi, J. S. Suh [et al.] // *Int. J. Cancer.* – 2011. – Vol. 128. – P. 2470–2480.
285. Lee, S. Peptide-based probes for targeted molecular imaging / S. Lee, J. Xie, X. Chen // *Biochemistry.* – 2010. – Vol. 49. – P. 1364–1376.
286. Lee, S. Y. The reverse proteomics for identification of tumor antigens / S. Y. Lee, D. Jeoung // *J. Microbiol. Biotechnol.* – 2007. – Vol. 17. – P. 879–890.
287. Lehmann, J. Antitumor activity of the antimicrobial peptide magainin II against bladder cancer cell lines / J. Lehmann, M. Retz, S. S. Sidhu [et al.] // *Eur. Urol.* – 2006. – Vol. 50. – P. 141–147.
288. Lehrer, R. I. Primate defensins / R. I. Lehrer // *Nat. Rev. Microbiol.* – 2004. – Vol. 2 (9). – P. 727–738.
289. Lei, H. Expression and functional characterization of tumor-targeted fusion protein composed of NGR peptide and 15-kDa actin fragment / H. Lei, P. Cao, G. Miao [et al.] // *Appl. Biochem. Biotechnol.* – 2010. – Vol. 162. – P. 988–995.

290. Leong, H. S. Invadopodia are required for cancer cell extravasation and are a therapeutic target for metastasis / H. S. Leong, A. E. Robertson, K. Stoletov [et al.] // *Cell Rep.* – 2014. – Vol. 8, № 5. – P. 1558–1570.
291. Lessene, G. BCL-2 family antagonists for cancer therapy / G. Lessene, P. E. Czabotar, P. M. Colman // *Nat. Rev. Drug Discov.* – 2008. – Vol. 7. – P. 989–1000.
292. Lewin, B. *Cells* / B. Lewin [et al.]. – M. : BINOM. Lab knowledge, 2011. – 951 p.
293. Lheureux, S. Molecularly targeted therapies in cancer: a guide for the nuclear medicine physician / S. Lheureux, C. Denoyelle, P. S. Ohashi [et al.] // *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* – 2017. – Vol. 44 (suppl. 1). – P. 41–54.
294. Li, H. Low frequency ultrasound and microbubbles combined with simvastatin promote the apoptosis of MCF 7 cells by affecting the LATS1/YAP/RHAMM pathway / H. Li, C. Chen, D. Wang // *Mol. Med. Rep.* – 2018. – Vol. 18, № 3. – P. 2724–2732.
295. Li, H. Expression of hyaluronan receptors CD44 and RHAMM in stomach cancers: relevance with tumor progression / H. Li, L. Guo, J. W. Li [et al.] // *Int. J. Oncol.* – 2000. – Vol. 17, № 5. – P. 927–932.
296. Li, H. Characteristics of expression of CD44v and receptor for HA-mediated motility (RHAMM) in multi-step gastroduodenal carcinogenesis / H. Li, J. Li, L. Guo // *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi.* – 1999. – Vol. 21, № 5. – P. 329–331.
297. Li, H. RHAMM deficiency disrupts folliculogenesis resulting in female hypofertility / H. Li, J. Moll, A. Winkler, L. Frappart [et al.] // *Biol. Open.* – 2015. – Vol. 4. – P. 562–571.
298. Li, J. Phosphorylation of BACH1 switches its function from transcription factor to mitotic chromosome regulator and promotes its interaction with HMMR / J. Li, H. Shima, H. Nishizawa [et al.] // *Biochem. J.* – 2018. – Vol. 475, № 5. – P. 981–1002.
299. Li, Y. Silencing of hyaluronan synthase 2 suppresses the malignant phenotype of invasive breast cancer cells / Y. Li, L. Li, T. J. Brown, P. Heldin // *Int. J. Cancer.* – 2007. – Vol. 120. – P. 2557–2567.
300. Liang, J. Hyaluronan and TLR4 promote surfactant-protein-C-positive alveolar progenitor cell renewal and prevent severe pulmonary fibrosis in mice / J. Liang, Y. Zhang, T. Xie, N. Liu [et al.] // *Nat. Med.* – 2016. – Vol. 22, № 11. – P. 1285–1293.
301. Liang, J. F. Synthesis of doxorubicin-peptide conjugate with multidrug resistant tumor cell killing activity / J. F. Liang, V. C. Yang // *Bioorg. Med. Chem Lett.* – 2005. – Vol. 15, № 22. – P. 5071–5075.
302. Lichtenstein, A. In vitro tumor cell cytolysis mediated by peptide defensins of human and rabbit granulocytes / A. Lichtenstein, T. Ganz, M. E. Selsted, R. I. Lehrer // *Blood.* – 1986. – Vol. 68. – P. 1407–1410.
303. Lincke, C. R. Multidrug resistance phenotype of human BRO melanoma cells transfected with a wild-type human *mdr1* complementary DNA / C. R. Lincke, A. M., van der Blik G. J. Schuurhuis [et al.] // *Cancer Res.* – 1990. – Vol. 50. – P. 1779–1785.
304. Lindgren, M. Overcoming methotrexate resistance in breast cancer tumor cells by the use of a new cell-penetrating peptide / M. Lindgren, K. Rosenthal-Aizman, K. Saar [et al.] // *Biochem. Pharmacol.* – 2006. – Vol. 71, № 4. – P. 416–425.
305. Lisabeth, E. M Eph receptor signaling and ephrins / E. M. Lisabeth, G. Falivelli, E. B. Pasquale // *Cold Spring Harb. Perspect Biol.* – 2013. – Vol. 5, № 9. – pii: a009159.
306. Liu, B. R. Arginine-rich cell-penetrating peptides deliver gene into living human cells / B. R. Liu, M. D. Lin, H. J. Chiang, H. J. Lee // *Gene.* – 2012. – Vol. 505. – P. 37–45.
307. Liu, M. Dissecting the dual nature of hyaluronan in the tumor microenvironment / M. Liu, C. Tolg, E. Turley // *Front. Immunol.* – 2019. – Vol. 10. – P. 947.
308. Liu, N. Hyaluronan synthase 3 overexpression promotes the growth of TSU prostate cancer cells / N. Liu, F. Gao, Z. Han [et al.] // *Cancer Res.* – 2001. – Vol. 61. – P. 5207–5214.
309. Liu, S. Enhancement of cytotoxicity of antimicrobial peptide magainin II in tumor cells by bombesin-targeted delivery / S. Liu, H. Yang, L. Wan [et al.] // *Acta Pharmacol. Sin.* – 2011. – Vol. 32. – P. 79–88.

310. Lofas, S. A novel hydrogel matrix on gold surfaces in surface plasmon resonance sensors for fast and efficient covalent immobilization of ligands / S. Lofas, B. Johnsson // *J. Chem. Soc., Chem Commun.* – 1990. – P. 1526–1528.
311. Lokeshwar, V. B. Differences in hyaluronic acid-mediated functions and signaling in arterial, micro-vessel, and vein-derived human endothelial cells / V. B. Lokeshwar, M. G. Selzer // *J. Biol. Chem.* – 2000. – Vol. 275. – P. 27641–27649.
312. Lokeshwar, V. B. Antitumor activity of hyaluronic acid synthesis inhibitor 4-methylumbelliferone in prostate cancer cells / V. B. Lokeshwar, L. E. Lopez D. Munoz [et al.] // *Cancer Res.* – 2010. – Vol. 70, № 7. – P. 2613–2623.
313. Lokeshwar, V. B. Stromal and epithelial expression of tumor markers hyaluronic acid and HYAL1 hyaluronidase in prostate cancer / V. B. Lokeshwar, D. Rubinowicz, G. L. Schroeder [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2001. – Vol. 276. – P. 11922–11932.
314. Lokeshwar, V. B. Targeting hyaluronic acid family for cancer chemoprevention and therapy / V. B. Lokeshwar, S. Mirza, A. Jordan // *Adv. Cancer Res.* – 2014. – Vol. 123. – P. 35–65.
315. Lopus, M. Editorial: tubulin-targeted cancer chemotherapeutics: advances and challenges / M. Lopus // *Curr. Top. Med. Chem.* – 2017. – Vol. 17, № 22. – P. 2522.
316. Lorenzo, H. K. Therapeutic potential of AIF-mediated caspase-independent programmed cell death / H. K. Lorenzo, S. A. Susin // *Drug Resist Updat.* – 2007. – Vol. 10, № 6. – P. 235–255.
317. Lou, J. Stress relaxing hyaluronic acid-collagen hydrogels promote cell spreading, fiber remodeling, and focal adhesion formation in 3D cell culture / J. Lou, R. Stowers, S. Nam [et al.] // *Biomaterials.* – 2018. – Vol. 154. – P. 213–222.
318. Luboldt, W. Visualization of somatostatin receptors in prostate cancer and its bone metastases with Ga-68-DOTATOC PET/CT / W. Luboldt, K. Zöphel, G. Wunderlich [et al.] // *Mol. Imaging. Biol.* – 2010. – Vol. 12, № 1. – P. 78–84.
319. Luyt, L. G. The design of radiolabeled peptides for targeting malignancies / L. G. Luyt // *Monoclonal antibody and peptide-targeted radiotherapy of cancer* / ed. Reilly R. M. Hoboken. – N. J., USA : John Wiley & Sons, Inc., 2010. – P. 101–120.
320. Luyt, L. G. Rhamm binding peptides / L. G. Luyt, E. A. Turley, K. V. Esguerra // *International Patent WO2011/150495.* – 2011.
321. Lynn, B. D. Identification of sequence, protein isoforms, and distribution of the hyaluronan-binding protein RHAMM in adult and developing rat brain / B. D. Lynn, X. Li, P. A. Cattini [et al.] // *J. Comp. Neurol.* – 2001. – Vol. 439, № 3. – P. 315–330.
322. Lyu, P. Identification and pharmaceutical evaluation of novel frog skin-derived serine proteinase inhibitor peptide-PE-BBI (Pelophylax esculentus Bowman-Birk inhibitor) for the potential treatment of cancer / P. Lyu, L. Ge, R. Ma [et al.] // *Sci. Rep.* – 2018. – Vol. 8, № 1. – P. 14502.
323. Ma, X. Loss of the hyaluronan receptor RHAMM prevents constrictive artery wall remodeling / X. Ma, J. D. Pearce, D. B. Wilson [et al.] // *J. Vasc. Surg.* – 2014. – Vol. 59, № 3. – P. 804–813.
324. Mader, J. S. Cationic antimicrobial peptides as novel cytotoxic agents for cancer treatment / J. S. Mader, D. W. Hoskin // *Expert. Opin. Investig. Drugs.* – 2006. – Vol. 15, № 8. – P. 933–46.
325. Maeda, H. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review / H. Maeda, J. Wu, T. Sawa [et al.] // *J. Control Release.* – 2000. – Vol. 65. – P. 271–284.
326. Majumdar, D. The medicinal chemistry of theragnostics, multimodality imaging and applications of nanotechnology in cancer / D. Majumdar, X. H. Peng, D. M. Shin // *Curr. Top. Med. Chem.* – 2010. – Vol. 10, № 12. – P. 1211–1226.
327. Makkar, S. Hyaluronic acid binding to TLR4 promotes proliferation and blocks apoptosis in colon cancer / S. Makkar, T. E. Riehl, B. Chen [et al.] // *Mol. Cancer Ther.* – 2019. – Vol. 18, № 12. – P. 2446–2456.
328. Manning, J. NEDD1: function in microtubule nucleation, spindle assembly and beyond / J. Manning, S. Kumar // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* – 2007. – Vol. 39. – P. 7–11.

329. Mansi, R. Bombesin-targeted PET of prostate cancer / R. Mansi, R. Minamimoto, H. Mäcke, A. H. Iagaru // *J. Nucl. Med.* – 2016. – Vol. 57 (Suppl 3). – P. 67S–72S.
330. Mansi, R. Evaluation of a 1,4,7,10-tetra-aza-cyclododecane-1,4,7,10-tetra-acetic acid-conjugated bombesin-based radioantagonist for the labeling with single-photon emission computed tomography, positron emission tomography, and therapeutic radionuclides / R. Mansi, X. Wang, F. Forrer [et al.] // *Clin. Cancer Res.* – 2009. – Vol. 15, № 16. – P. 5240–5249.
331. Manskikh, V. N. Pathways of cell death and their biological importance / V. N. Manskikh // *Tsitologiya.* – 2007. – Vol. 49, № 11. – P. 909–915.
332. Manzanares, D. Apical oxidative hyaluronan degradation stimulates airway ciliary beating via RHAMM and RON / D. Manzanares, M.-E. Monzon, R. C. Savani, M. Salathe // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* – 2007. – Vol. 37, № 2. – P. 160–168.
333. Martin, M. E. Peptide-guided gene delivery / M. E. Martin, K. G. Rice // *AAPS J.* – 2007. – Vol. 9. – E18–E20.
334. Marusyk, A. Intra-tumour heterogeneity: A looking glass for cancer? / A. Marusyk, V. Almendro, K. Polyak // *Nat. Rev. Cancer.* – 2012. – Vol. 12, № 5. – P. 323–334.
335. Mascaró, M. Low molecular weight hyaluronan induces migration of human choriocarcinoma JEG-3 cells mediated by RHAMM as well as by PI3K and MAPK pathways / M. Mascaró, M. A. Pibuel, S. L. Lomparía [et al.] // *Histochem. Cell Biol.* – 2017. – Vol. 148, № 2. – P. 173–187.
336. Mason, K. D. In vivo efficacy of the Bcl-2 antagonist ABT-737 against aggressive Myc-driven lymphomas / K. D. Mason, C. J. Vandenberg, C. L. Scott [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2008. – Vol. 105. – P. 17961–17966.
337. Matou-Nasri, S. Oligosaccharides of hyaluronan induce angiogenesis through distinct CD44 and RHAMM-mediated signalling pathways involving Cdc2 and gamma-adducin / S. Matou-Nasri, J. Gaffney, S. Kumar, M. Slevin // *Int. J. Oncol.* – 2009. – Vol. 35, № 4. – P. 761–773.
338. Matsumura, Y. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumorotropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs / Y. Matsumura, H. Maeda // *Cancer Res.* – 1986. – Vol. 46. – P. 6387–6392.
339. Matsuzaki, K. Interactions of an antimicrobial peptide, magainin 2: with outer and inner membranes of Gram-negative bacteria / K. Matsuzaki, K. Sugishita, M. Harada [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1997. – Vol. 1327. – P. 119–130.
340. Maxwell, C. A. Receptor for hyaluronan-mediated motility correlates with centrosome abnormalities in multiple myeloma and maintains mitotic integrity / C. A. Maxwell, J. J. Keats, A. R. Belch [et al.] // *Cancer Res.* – 2005. – Vol. 65, № 3. – P. 850–60.
341. Maxwell, C. A. RHAMM is a centrosomal protein that interacts with dynein and maintains spindle pole stability / C. A. Maxwell, J. J. Keats, M. Crainie [et al.] // *Mol. Biol. Cell.* – 2003. – Vol. 14. – P. 2262–2276.
342. Maxwell, C. A. RHAMM expression and isoform balance predict aggressive disease and poor survival in multiple myeloma / C. A. Maxwell, E. Rasmussen, F. Zhan [et al.] // *Blood.* – 2004. – Vol. 104. – P. 1151–1158.
343. Maxwell1, C. A. Cell-surface and mitotic-spindle RHAMM: moonlighting or dual oncogenic functions? / C. A. Maxwell1, J. McCarthy, E. Turley // *Journal of Cell Science.* – 2008. – Vol. 121. – P. 925–932.
344. May, G. L. Plasma membrane lipid composition of vinblastine sensitive and resistant human leukaemic lymphoblasts / G. L. May, L. C. Wright, M. Dyne [et al.] // *Int. J. Cancer.* – 1988. – Vol. 42. – P. 728–733.
345. McAtee, C. O. Emerging roles for hyaluronidase in cancer metastasis and therapy / C. O. McAtee, J. J. Barycki, M. A. Simpson // *Adv. Cancer Res.* – 2014. – Vol. 123. – P. 1–34.
346. McCarthy, J. B. Hyaluronan, cancer-associated fibroblasts and the tumor microenvironment in malignant progression / J. B. McCarthy, D. El-Ashry, E. A. Turley // *Front. Cell Dev. Biol.* – 2018. – Vol. 6. – P. 48.

347. McCourt, P. A. G. Characterization of a hyaluronan receptor on rat sinusoidal liver endothelial cells and its functional relationship to scavenger receptors / P. A. G. McCourt, B. H. Smedsrod, J. Melkko, S. Johansson // *Hepatology*. – 1999. – Vol. 30. – P. 1276–1286.
348. McGranahan, N. Biological and therapeutic impact of intratumor heterogeneity in cancer evolution / N. McGranahan, C. Swanton // *Cancer Cell*. – 2015. – Vol. 27, № 1. – P. 15–26.
349. McKee, C. M. Hyaluronan fragments induce nitric-oxide synthase in murine macrophages through anuclear factor kappaB-dependent mechanism / C. M. McKee, C. J. Lowenstein, M. R. Horton [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1997. – Vol. 272, № 12. – P. 8013–8018.
350. McKeown, S. T. The cytotoxic effects of human neutrophil peptide-1 (HNP1) and lactoferrin on oral squamous cell carcinoma (OSCC) in vitro / S. T. McKeown, F. T. Lundy, J. Nelson [et al.] // *Oral. Oncol.* – 2006. – Vol. 42. – P. 685–690.
351. Mehta, R. R. A cell penetrating peptide derived from azurin inhibits angiogenesis and tumor growth by inhibiting phosphorylation of VEGFR-2, FAK and Akt / R. R. Mehta, T. Yamada, B. N. Taylor [et al.] // *Angiogenesis*. – 2011. – Vol. 14, № 3. – P. 355–369.
352. Meier, C. Association of RHAMM with E2F1 promotes tumour cell extravasation by transcriptional up-regulation of fibronectin / C. Meier, A. Spitschak, K. Abshagen [et al.] // *J. Pathol.* – 2014. – Vol. 234, № 3. – P. 351–364.
353. Melle, C. Discovery and identification of alpha-defensins as low abundant, tumor-derived serum markers in colorectal cancer / C. Melle, G. Ernst, B. Schimmel [et al.] // *Gastroenterology*. – 2005. – Vol. 129. – P. 66–73.
354. Merbel, A. F. V. D. Protocols for migration and invasion studies in prostate cancer / A. F. V. D. Merbel, G. V. D. Horst, J. T. Buijs, G. V. D. Pluijm // *Methods Mol. Biol.* – 2018. – Vol. 1786. – P. 67–79.
355. Mevel, M. Important role of phosphoramido linkage in imidazole-based dioleoyl helper lipids for liposome stability and primary cell transfection / M. Mevel, T. Haudebourg, T. Colombani [et al.] // *J. Gene Med.* – 2016. – Vol. 18, № 1-3. – P. 3–15.
356. Meyer-Losic, F. DTS-108, a novel peptidic prodrug of SN38: in vivo efficacy and toxicokinetic studies / F. Meyer-Losic, C. Nicolazzi, J. Quinonero [et al.] // *Clin. Cancer Res.* – 2008. – Vol. 14. – P. 2145–2153.
357. Midgley, A. C. Transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1)-stimulated fibroblast to myofibroblast differentiation is mediated by hyaluronan (HA)-facilitated epidermal growth factor receptor (EGFR) and CD44 co-localization in lipid rafts / A. C. Midgley, M. Rogers, M. B. Hallett [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2013. – Vol. 288, № 21. – P. 14824–14838.
358. Milletti, F. Cell-penetrating peptides: classes, origin, and current landscape / F. Milletti // *Drug Discov. Today*. – 2012. – Vol. 17. – P. 850–860.
359. Minchin, R. F. Nanoparticles for molecular imaging—an overview / R. F. Minchin, D. J. Martin // *Endocrinology*. – 2010. – Vol. 151. – P. 474–481.
360. Mishra, A. P. Programmed cell death, from a cancer perspective: an overview / A. P. Mishra, B. Salehi, M. Sharifi-Rad [et al.] // *Mol. Diagn. Ther.* – 2018. – Vol. 22, № 3. – P. 281–295.
361. Misra, S. Interactions between hyaluronan and its receptors (CD44, RHAMM) regulate the activities of inflammation and cancer / S. Misra, V. C. Hascall, R. R. Markwald, S. Ghatak // *Front. Immunol.* – 2015. – Vol. 6. – P. 201.
362. Misra, S. Hyaluronan-CD44 interactions as potential targets for cancer therapy / S. Misra, P. Heldin, V. C. Hascall [et al.] // *FEBS J*278. – 2011. – P. 1429–1443.
363. Miyashita, T. Bcl-2 oncoprotein blocks chemotherapy-induced apoptosis in a human leukemia cell line / T. Miyashita, J. C. Reed // *Blood*. – 1993. – Vol. 81. – P. 151–157.
364. Mohapatra, S. Soluble hyaluronan receptor RHAMM induces mitotic arrest by suppressing Cdc2 and cyclin B1 expression / S. Mohapatra, X. Yang, J. A. Wright [et al.] // *J. Exp. Med.* – 1996. – Vol. 183. – P. 1663–1668.
365. Montgomery, N. CD44 enhances invasion of basal-like breast cancer cells by upregulating serine protease and collagen-degrading enzymatic expression and activity / N. Montgomery, A. Hill, S. McFarlane [et al.] // *Breast Cancer Res.* – 2012. – Vol. 14, № 3. – P. R84.

366. Moore, A. J. Preliminary experimental anticancer activity of cecropins / A. J. Moore, D. A., M. C. Bibby // *Pept. Res.* – 1994. – Vol. 7. – P. 265–269.
367. Moore, N. M. De-convoluting cancer's complexity: using a 'physical sciences lens' to provide a different (clearer) perspective of cancer / N. M. Moore, N. Z. Kuhn, S. E. Hanlon [et al.] // Preface. *Phys. Biol.* – 2011. – Vol. 8, № 1. – P. 23–28.
368. Moreau, C. Minimal BH3 peptides promote cell death by antagonizing anti-apoptotic proteins / C. Moreau, P. F. Cartron, A. Hunt [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2003. – Vol. 278. – P. 19426–19435.
369. Morera, D. S. Hyaluronic acid family in bladder cancer: potential prognostic biomarkers and therapeutic targets / D. S. Morera, M. S. Hennig, A. Talukder [et al.] // *Br. J. Cancer.* – 2017. – Vol. 117, № 10. – P. 1507–1517.
370. Muchmore, S. W. X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death / S. W. Muchmore, M. Sattler, H. Liang [et al.] // *Nature.* – 1996. – Vol. 381. – P. 335–341.
371. Mukhopadhyay, R. Molecular mechanisms for organizing the neuronal cytoskeleton / R. Mukhopadhyay, S. Kumar, J. H. Hoh // *Bioessays.* – 2004. – Vol. 26. – P. 1017–1025.
372. Mummert, M. E. Development of a peptide inhibitor of hyaluronan-mediated leukocyte trafficking / M. E. Mummert, M. Mohamadzadeh, D. I. Mummert [et al.] // *J. Exp. Med.* – 2000. – Vol. 192. – P. 769–779.
373. Mummert, M. E. Functional roles of hyaluronan in B16-F10 melanoma growth and experimental metastasis in mice / M. E. Mummert, D. I. Mummert, L. Ellinger, A. Takashima // *Mol. Cancer Ther.* – 2003. – Vol. 2. – P. 295–300.
374. Nagata, S. Apoptosis by death factor / S. Nagata // *Cell.* – 1997. – Vol. 88, № 3. – P. 355–365.
375. Nagel, S. Co-expression of CD44 variant isoforms and receptor for hyaluronic acid-mediated motility (RHAMM, CD168) is an international prognostic index and C-MYC gene status-independent predictor of poor outcome in diffuse large B-cell lymphomas / S. Nagel, P. Hirschmann, S. Dirnhofer [et al.] // *Exp. Hematol.* – 2010. – Vol. 38. – P. 38–45.
376. Nagy, N. 4-Methylumbelliferone treatment and hyaluronan inhibition as a therapeutic strategy in inflammation, autoimmunity, and cancer / N. Nagy, H. F. Kuipers, Frymoyer A. R. [et al.] // *Front. Immunol.* – 2015. – Vol. 6. – P. 123.
377. Nanda, P. K. Positron-emission tomography (PET) imaging agents for diagnosis of human prostate cancer: agonist vs. antagonist ligands / P. K. Nanda, B. E. Wienhoff, T. L. Rold [et al.] // *In Vivo.* – 2012. – Vol. 26, № 4. – P. 583–592.
378. Naor, D. RHAMM-derived peptide for treatment of diabetes / D. Naor, N. P. Akentieva, E. Turley. – International Patent № 12459. June 2013. 40 Yissum Research Development company of the Hebrew University of Jerusalem, Israel. United States Provisional Patent Application No. 62/560,790 «Rhamm-derived peptide for treatment of diabetes» – Ref: 2513453 SL/nb.
379. Nasrolahi, S. A. Cyclic peptide-capped gold nanoparticles as drug delivery systems / S. A. Nasrolahi, D. Mandal, R. K. Tiwari [et al.] // *Mol. Pharm.* – 2013. – Vol. 10 – P. 500–511.
380. Naumov, G. N. Ineffectiveness of doxorubicin treatment on solitary dormant mammary carcinoma cells or late-developing metastases / G. N. Naumov, J. L. Townson, I. C. MacDonald [et al.] // *Breast. Cancer Res. Treat.* – 2003. – Vol. 82. – P. 199–206.
381. Ndinguri, M. W. Peptide targeting of platinum anti-cancer drugs / M. W. Ndinguri, R. Solipuram, R. P. Gambrell [et al.] // *Bioconj. Chem.* – 2009. – Vol. 20. – P. 1869–1878.
382. Nguyen, Q. T. Surgery with molecular fluorescence imaging using activatable cell-penetrating peptides decreases residual cancer and improves survival / Q. T. Nguyen, E. S. Olson, T. A. Aguilera [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2010. – Vol. 107. – P. 4317–4322.
383. Nickel, W. Unconventional secretory routes: direct protein export across the plasma membrane of mammalian cells / W. Nickel // *Traffic.* – 2005. – Vol. 6. – P. 607–614.
384. Nicolaou, K. C. Total synthesis of sanglifehrin A. / K. C. Nicolaou, F. Murphy, S. Barluenga [et al.] // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* – 1999. – Vol. 38. – № 16. – P. 2447–2451.
385. Nicolini, A. Cytokines in breast cancer / A. Nicolini, A. Carpi, G. Rossi // *Cytokine Growth Factor Rev.* – 2006. – Vol. 17, № 5. – P. 325–337.

386. Nicolson, G. L. Cell membrane fluid-mosaic structure and cancer metastasis / G. L. Nicolson // *Cancer Res.* – 2015. – Vol. 75, № 7. – P. 1169–1176.
387. Nie, D. Cyclooxygenases and lipoxygenases in prostate and breast cancers / D. Nie // *Front. Biosci.* – 2007. – Vol. 12. – P. 1574–1585.
388. Nikitovic, D. The roles of hyaluronan/RHAMM/CD44 and their respective interactions along the insidious pathways of fibrosarcoma progression / D. Nikitovic, K. Kouvidi, N. K. Karamanos, G. N. Tzanakakis // *Biomed. Res. Int.* – 2013. – Vol. 2013. – P. 929531.
389. Nikitovic, D. Cancer microenvironment and inflammation: role of hyaluronan / D. Nikitovic, M. Tzardi, A. Berdiaki [et al.] // *Front. Immunol.* – 2015. – Vol. 6. – P. 169–179.
390. Nilsson, F. Targeted delivery of tissue factor to the ED-B domain of fibronectin, a marker of angiogenesis, mediates the infarction of solid tumors in mice / F. Nilsson, H. Kosmehl, L. Zardi, D. Neri // *Cancer Res.* – 2001. – Vol. 61. – P. 711–716.
391. Nishimura, M. Effect of defensin peptides on eukaryotic cells: primary epithelial cells, fibroblasts and squamous cell carcinoma cell lines / M. Nishimura, Y. Abiko, Y. Kurashige [et al.] // *J. Dermatol. Sci.* – 2004. – Vol. 36. – P. 87–95.
392. Noble, P. W. Hyaluronate activation of CD44 induces insulin-like growth factor-1 expression by a tumor necrosis factor-alpha-dependent mechanism in murine macrophages / P. W. Noble, F. R. Lake, P. M. Henson, D. Riches // *J. Clin. Invest.* – 1993. – Vol. 91. – P. 2368–2377.
393. Nogales, E. Structural insight into microtubule function / E. Nogales // *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* – 2001. – Vol. 30. – P. 397–420.
394. Nousiainen, M. Phosphoproteome analysis of the human mitotic spindle / M. Nousiainen, H. H. Sillje, G. Sauer [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2006. – Vol. 103. – P. 5391–5396.
395. Okuda, H. Hyaluronan synthase HAS2 promotes tumor progression in bone by stimulating the interaction of breast cancer stem-like cells with macrophages and stromal cells / H. Okuda, A. Kobayashi, B. Xia [et al.] // *Cancer Res.* – 2012. – Vol. 72, № 2. – P. 537–47.
396. Oldenburg, D. CD44 and RHAMM are essential for rapid growth of bladder cancer driven by loss of glycogen debranching enzyme (AGL) / D. Oldenburg, Y. Ru, B. Weinhaus. [et al.] // *BMC Cancer.* – 2016. – Vol. 16, № 1. – P. 713.
397. Olopade, O. I. Overexpression of BCL-x protein in primary breast cancer is associated with high tumor grade and nodal metastases / O. I. Olopade, M. O. Adeyanju, A. R. Safa [et al.] // *Cancer J. Sci. Am.* – 1997. – Vol. 3. – P. 230–237.
398. Otto, T. Stabilization of N-Myc is a critical function of aurora A in human neuroblastoma / T. Otto, S. Horn, M. Brockmann [et al.] // *Cancer Cell.* – 2009. – Vol. 15. – P. 67–78.
399. Otvos, L. Jr. Antibacterail peptides and proteins with multiple cellular targets / L. Otvos Jr. // *J. Pept. Sci.* – 2005. – Vol. 11, № 11. – P. 697–706.
400. Panda, P. K. Mechanism of autophagic regulation in carcinogenesis and cancer therapeutics / P. K. Panda, S. Mukhopadhyay, D. N. Das // *Semin. Cell Dev. Biol.* – 2015. – Vol. 39. – P. 43–55.
401. Pannier, A. K. Controlled release systems for DNA delivery / A. K. Pannier, L. D. Shea // *Mol. Ther.* – 2004. – Vol. 10, № 1. – P. 19–26.
402. Pantschenko, A. G. The interleukin-1 family of cytokines and receptors in human breast cancer: implications for tumor progression / A. G. Pantschenko, I. Pushkar, K. H. Anderson [et al.] // *Int. J. Oncol.* – 2003. – Vol. 23, № 2. – P. 269–284.
403. Parekh, A. Regulation of invadopodia by mechanical signaling / A. Parekh, A. M. Weaver // *Exp. Cell Res.* – 2016. – Vol. 343, № 1. – P. 89–95.
404. Park, D. Hyaluronic acid promotes angiogenesis by inducing RHAMM-TGFβ receptor interaction via CD44-PKCδ / D. Park, Y. Kim, H. Kim [et al.] // *Mol. Cells.* – 2012. – Vol. 33, № 6. – P. 563–574.
405. Park, J. Mutational analysis of a human immunodeficiency virus type 1 Tat protein transduction domain which is required for delivery of an exogenous protein into mammalian cells / J. Park, J. Ryu, K. A. Kim [et al.] // *J. Gen. Virol.* – 2002. – Vol. 83. – P. 1173–1181.

406. Park, S. Y. Prediction of micrometastasis (< 1 cm) to pelvic lymph nodes in prostate cancer: role of preoperative MRI / S. Y. Park, Y. T. Oh, D. C. Jung [et al.] // *Am. J. Roentgenol.* – 2015. – Vol. 205, № 3. – P. W328–334.
407. Parry, J. J. Micro-PET imaging of breast cancer using radiolabeled bombesin analogs targeting the gastrin-releasing peptide receptor / J. J. Parry, R. Andrews, B. E. Rogers // *Breast Cancer Res. Treat.* – 2007. – Vol. 101, № 2. – P. 175–183.
408. Paschal, B. M. Interaction of brain cytoplasmic dynein and MAP2 with a common sequence at the C terminus of tubulin / B. M. Paschal, R. A. Obar, R. B. Vallee // *Nature.* – 1989. – Vol. 342. – P. 569–572.
409. Pasqualini, R. Aminopeptidase N is a receptor for tumor-homing peptides and a target for inhibiting angiogenesis / R. Pasqualini, E. Koivunen, R. Kain [et al.] // *Cancer Res.* – 2000. – Vol. 60. – P. 722–727.
410. Passi, A. Dissecting the role of hyaluronan synthases in the tumor microenvironment / A. Passi, D. Vigetti, S. Buraschi, R. V. Iozzo // *FEBS J.* – 2019. – Vol. 286, № 15. – P. 2937–2949.
411. Pastorino, F. Targeting liposomal chemotherapy via both tumor cell-specific and tumor vasculature-specific ligands potentiates therapeutic efficacy / F. Pastorino, C. Brignole, P. D. Di [et al.] // *Cancer Res.* – 2006. – Vol. 66. – P. 10073–10082.
412. Pastorino, F. Vascular damage and anti-angiogenic effects of tumor vessel-targeted liposomal chemotherapy / F. Pastorino, C. Brignole, D. Marimpietri [et al.] // *Cancer Res.* – 2003. – Vol. 63. – P. 7400–7409.
413. Pastorino, F. Enhanced antitumor efficacy of clinical-grade vasculature-targeted liposomal doxorubicin / F. Pastorino, D. Di Paolo, F. Piccardi [et al.] // *Clin Cancer Res.* – 2008. – Vol. 14, № 22. – P. 7320–7329.
414. Patel, A. R. EphA2 targeting pegylated nanocarrier drug delivery system for treatment of lung cancer / A. R. Patel, M. Chougule, M. Singh // *Pharm. Res.* – 2014. – Vol. 31. – P. 2796–2809.
415. Patrzykat, A. Novel antimicrobial peptides derived from flatfish genes / A. Patrzykat, J. W. Gallant, J. K. Seo. [et al.] // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2003. – Vol. 47. – P. 2464–2470.
416. Perschl, A. Role of CD44 cytoplasmic domain in hyaluronan binding / A. Perschl, J. Lesley, N. English [et al.] // *Eur. J. Immunol.* – 1995. – Vol. 25, № 2. – P. 495–501.
417. Peter, M. E. Advances in apoptosis research / M. E. Peter, A. E. Heufelder and M. O. Hengartner // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1997. – Vol. 94 № 24. – P. 12736–12737.
418. Petit, P. X. Mitochondria and programmed cell death: back to the future / P. X. Petit, S. A. Susin, N. Zamzami [et al.] // *FEBS Lett.* – 1996. – Vol. 396, № 1. – P. 7–13.
419. Petros, A. M. Solution structure of the antiapoptotic protein bcl-2 / A. M. Petros, A. Medek, D. G. Nettlesheim [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2001. – Vol. 98. – P. 3012–3017.
420. Phillips, K. A. Making genomic medicine evidence-based and patient-centered: a structured review and landscape analysis of comparative effectiveness research / K. A. Phillips P. A. Deverka, H. C. Sox [et al.] // *Genet Med.* – 2017. – Vol. 19, № 10. – P. 1081–1091.
421. Piccioni, F. Antitumor effects of hyaluronic acid inhibitor 4-methylumbelliferone in an orthotopic hepatocellular carcinoma model in mice / F. Piccioni, M. Malvicini, M. G. Garcia [et al.] // *Glycobiology.* – 2012. – Vol. 22. – P. 400–410.
422. Pilch, J. Peptides selected for binding to clotted plasma accumulate in tumor stroma and wounds / J. Pilch, D. M. Brown, M. Komatsu [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2006. – Vol. 103. – P. 2800–2804.
423. Pinaud, F. Advances in fluorescence imaging with quantum dot bio-probes / F. Pinaud, X. Michalet, L. A. Bentolila [et al.] // *Biomaterials.* – 2006. – Vol. 27. – P. 1679–1687.
424. Pitti, R. M. Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family / R. M. Pitti, S. A. Marsters, S. Ruppert [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1996. – Vol. 271. – № 22. – P. 12687–12690.
425. Platt, V. M. Anticancer therapeutics: targeting macromolecules and nanocarriers to hyaluronan or CD44, a hyaluronan receptor / V. M. Platt, F. C. Szoka Jr. // *Mol. Pharm.* – 2008. – Vol. 5, № 4. – P. 474–486.

426. Podor, T. J. Vimentin exposed on activated platelets and platelet microparticles localizes vitronectin and plasminogen activator inhibitor complexes on their surface / T. J. Podor, D. Singh, P. Chindemi [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2002. – Vol. 277. – P. 7529–7539.
427. Pooga, M. Classes of cell-penetrating peptides / M. Pooga, U. Langel // *Methods Mol. Biol.* – 2015. – Vol. 1324. – P. 3–28.
428. Price, Z. K. Differing Roles of Hyaluronan Molecular Weight on Cancer Cell Behavior and Chemotherapy Resistance / Z. K. Price, N. A. Lokman, C. Ricciardelli // *Cancers (Basel)*. – 2018. – Vol. 10, № 12. – P. 482.
429. Provenzano, P. P. Enzymatic targeting of the stroma ablates physical barriers to treatment of pancreatic ductal adenocarcinoma / P. P. Provenzano, C. Cuevas, A. E. Chang [et al.] // *Cancer Cell*. – 2012. – Vol. 21. – P. 418–429.
430. Prudovsky, I. Secretion without Golgi / I. Prudovsky, F. Tarantini, M. Landriscina [et al.] // *J. Cell. Biochem.* – 2008. – Vol. 103, № 5. – P. 1327–1343.
431. Ptaszyńska, N. Conjugates of Ciprofloxacin and Levofloxacin with Cell-Penetrating Peptide Exhibit Antifungal Activity and Mammalian Cytotoxicity / N. Ptaszyńska, K. Gucwa, K. Olkiewicz [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2020. – Vol. 21, № 13. – P. 4696.
432. Qadri, M. Role of CD44 in regulating TLR2 activation of human macrophages and downstream expression of pro-inflammatory cytokines / M. Qadri, S. Almadani, G. D. Jay, K. A. Elsaid // *J. Immunol.* – 2018. – Vol. 200, № 2. – P. 758–767.
433. Qian, B. Z. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis / B. Z. Qian, J. W. Pollard // *Cell*. – 2010. – Vol. 141. – P. 39–51.
434. Qian, T. Mitochondrial permeability transition in pH-dependent reperfusion injury to rat hepatocytes / T. Qian, A. L. Nieminen, B. Herman [et al.] // *Am. J. Physiol.* – 1997. – Vol. 273, № 6 Pt1. – P. C1783–1792.
435. Qvit, N. Highly specific modulators of protein kinase C localization: applications to heart failure / N. Qvit, D. Mochly-Rosen // *Drug discov. today disc. mech.* – 2010. – Vol. 7, № 2. – P. e87–e93.
436. Rani, P. Acetamides: chemotherapeutic agents for inflammation-associated cancers / P. Rani, D. Pal, R. R. Hegde, S. R. Hashim // *J. Chemother.* – 2016. – Vol. 28, № 4. – P. 255–265.
437. Raucher, D. Cell-penetrating peptides: strategies for anticancer treatment / D. Raucher, J. S. Ryu // *Trends Mol. Med.* – 2015. – Vol. 21. – P. 560–570.
438. Reardon, D. A. Randomized phase II study of cilengitide, an integrin-targeting arginine-glycine-aspartic acid peptide, in recurrent glioblastoma multiforme / D. A. Reardon, K. L. Fink, T. Mikkelsen [et al.] // *J. Clin. Oncol.* – 2008. – Vol. 26. – P. 5610–5617.
439. Reckamp, K. L. Molecular targets beyond the big 3 / K. L. Reckamp // *Thorac. Surg. Clin.* – 2020. – Vol. 30, № 2. – P. 157–164.
440. Rekdal, O. Relative spatial positions of tryptophan and cationic residues in helical membrane-active peptides determine their cytotoxicity / O. Rekdal, B. E. Haug, M. Kalaaji [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2012. – Vol. 287. – P. 233–244.
441. Riedl, S. In search of a novel target - phosphatidylserine exposed by non-apoptotic tumor cells and metastases of malignancies with poor treatment efficacy / S. Riedl, B. Rinner, M. Asslaber [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2011. – Vol. 1808. – P. 2638–2645.
442. Riedl, S. Membrane-active host defense peptides--challenges and perspectives for the development of novel anticancer drugs / S. Riedl, D. Zweytick, K. Lohner // *Chem. Phys. Lipids.* – 2011. – V. 164. – P. 766–781.
443. Rizzardi, A. E. Elevated hyaluronan and hyaluronan-mediated motility receptor are associated with biochemical failure in patients with intermediate-grade prostate tumors / A. E. Rizzardi, R. I. Vogel, J. S. Koopmeiners [et al.] // *Cancer*. – 2014. – Vol. 120, № 12. – P. 1800–1809.
444. Roberts, A. W. Substantial susceptibility of chronic lymphocytic leukemia to BCL2 inhibition: results of a phase I study of navitoclax in patients with relapsed or refractory disease / A. W. Roberts, J. F. Seymour, J. R. Brown [et al.] // *J. Clin. Oncol.* – 2012. – Vol. 30. – P. 488–496.

445. Rothbard, J. B. Role of membrane potential and hydrogenbonding in the mechanism of translocation of guanidinium-rich peptides into cells / J. B. Rothbard, T. C. Jessop, R. S. Lewis [et al.] // *J. Am. Chem. Soc.* – 2004. – Vol. 126. – P. 9506–9507.
446. Roukos, D. H. Spatiotemporal diversification of intrapatient genomic clones and early drug development concepts realize the roadmap of precision cancer medicine / D. H. Roukos // *Drug Discov. Today*. – 2017. – Vol. 22, № 8. – P. 1148–1164.
447. Roulot, A. Tumoral heterogeneity of breast cancer / A. Roulot, D. Héquet, J. M. Guinebrière [et al.] // *Ann. Biol. Clin.* – 2016. – Vol. 74, № 6. – P. 653–660.
448. Rozengurt, E. Yes-associated protein (YAP) in pancreatic cancer: at the epicenter of a targetable signaling network associated with patient survival / E. Rozengurt, J. Sinnett-Smith, G. Eibl // *Signal Transduct. Target Ther.* – 2018. – Vol. 3. – P. 11.
449. Ruan, B. Engineering subtilisin into a fluoride-triggered processing protease useful for one-step protein purification / B. Ruan, K. E. Fisher, P. A. Alexander [et al.] // *Biochemistry*. – 2004. – Vol. 43, № 46. – P. 14539–46.
450. Ruben, S. Structural and functional characterization of human immunodeficiency virus tat protein / S. Ruben, A. Perkins, R. Purcell, K. [et al.] // *J. Virol.* – 1989. – Vol. 63. – P. 1–8.
451. Ruffell, B. Differential macrophage programming in the tumor microenvironment / B. Ruffell, N. I. Affara, L. M. Coussens // *Trends Immunol.* – 2012. – Vol. 33. – P. 119–126.
452. Ruoslahti, E. Tumor penetrating peptides for improved drug delivery / E. Ruoslahti // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2017. – Vol. 110–111. – P. 3–12.
453. Ryan, J. M. Enhancing the safety of antibody-based immunomodulatory cancer therapy without compromising therapeutic benefit: Can we have our cake and eat it too? / J. M. Ryan, J. S. Wasser, A. J. Adler, A. T. Vella // *Expert Opin. Biol. Ther.* – 2016. – Vol. 16, № 5. – P. 655–674.
454. Rydberg, H. A. Effects of tryptophan content and backbone spacing on the uptake efficiency of cell-penetrating peptides / H. A. Rydberg, M. Matson, H. L. Amand [et al.] // *Biochemistry*. – 2012. – Vol. 51. – P. 5531–5539.
455. Sabeh, F. Protease-dependent versus-independent cancer cell invasion programs: three-dimensional amoeboid movement revisited / F. Sabeh, R. Shimizu-Hirota, S. J. Weiss // *Journal of Cell Biology*. – 2009. – Vol. 185. – P. 11–19.
456. Sackett, D. L. Tubulin subunit carboxyl termini determine polymerization efficiency / D. L. Sackett, B. Bhattacharyya, J. Wolff // *J. Biol. Chem.* – 1985. – Vol. 260, № 1. – P. 43–45.
457. Saito, M. BAX-dependent transport of cytochrome c reconstituted in pure liposomes / M. Saito, S. J. Korsmeyer, P. H. Schlesinger // *Nat. Cell Biol.* – 2000. – Vol. 2. – P. 553–555.
458. Saito, T. 4-methylumbelliferone leads to growth arrest and apoptosis in canine mammary tumor cells / T. Saito, D. Tamura, T. Nakamura [et al.] // *Oncol. Rep.* – 2013. – Vol. 29. – P. 335–342.
459. Saleh, F. Melanoma immunotherapy: past, present, and future / F. Saleh, W. Renno, I. Klepacek [et al.] // *Curr. Pharm. Des.* – 2005. – Vol. 11. – P. 3461–3473.
460. Samuel, P. The diagnostic and prognostic potential of microRNAs in epithelial ovarian carcinoma / P. Samuel, D. R. Carter // *Mol. Diagn. Ther.* – 2017. – Vol. 21. – P. 59–73.
461. Samuelsson, C. Studies on the interaction between hyaluronan and a rat colon cancer cell line / C. Samuelsson, S. Gustafson // *Glycoconj J.* – 1998. – Vol. 15, № 2. – P. 169–175.
462. Santoro, A. Activity and safety of NGR-hTNF, a selective vascular-targeting agent, in previously treated patients with advanced hepatocellular carcinoma / A. Santoro, T. Pressiani, G. Citterio [et al.] // *Br. J. Cancer*. – 2010. – Vol. 103. – P. 837–844.
463. Sato, N. Role of hyaluronan in pancreatic cancer biology and therapy: once again in the spotlight / N. Sato, S. Kohi, K. Hirata., M. Goggins // *Cancer Sci.* – 2016. – Vol. 277. – P. 1939–1956.
464. Savani, R. C. Migration of bovine aortic smooth muscle cells after wounding injury. The role of hyaluronan and RHAMM / R. C. Savani, C. Wang, B. Yang [et al.] // *J. Clin. Investigation*. – 1995. – Vol. 95. – P. 1158–1168.
465. Sawant, R. Intracellular transduction using cell-penetrating peptides / R. Sawant, V. Torchilin // *Mol. Biosyst.* – 2010. – Vol. 6. – P. 628–640.

466. Sawant, R. Intracellular delivery of nanoparticles with CPPs / R. Sawant, V. Torchilin // *Methods Mol. Biol.* – 2011. – Vol. 683. – P. 431–451.
467. Sawant, R. M. “SMART” drug delivery systems: double-targeted pH-responsive pharmaceutical nanocarriers / R. M. Sawant, J. P. Hurley, S. Salmaso [et al.] // *Bioconjug. Chem.* – 2006. – Vol. 17. – P. 943–949.
468. Schmitt, C. A. Genetic analysis of chemoresistance in primary murine lymphomas / C. A. Schmitt, C. T. Rosenthal, S. W. Lowe // *Nat. Med.* – 2000. – Vol. 6. – P. 1029–1035.
469. Schmitt, M. Peptide vaccines for patients with acute myeloid leukemia / M. Schmitt, R. Casalegno-Garduño, X. Xu, A. Schmitt // *Expert. Rev. Vaccines.* – 2009. – Vol. 8. – P. 1415–1425.
470. Schmitt, M. HAMM-R3 peptide vaccination in patients with acutemyeloid leukemia, myelodysplastic syndrome, and multiple myelomaelicits immunologic and clinical responses / M. Schmitt, A. Schmitt, M. T. Rojewski [et al.] // *Blood.* – 2008. – Vol. 111. – P. 1357–1365.
471. Schreer, A. Application of Alamar blue/5-carboxyfluorescein diacetate acetoxyethyl ester as a noninvasive cell viability assay in primary hepatocytes from rainbow trout / A. Schreer, C. Tinson, J. P. Sherry, K. Schirmer // *Anal Biochem.* – 2005. – Vol. 344, № 1. – P. 76–85.
472. Schwertfeger, K. L. Hyaluronan, inflammation, and breast cancer progression / K. L. Schwertfeger, M. K. Cowman, P. G. Telmer [et al.] // *Front. Immunol.* – 2015. – Vol. 6. – P. 236.
473. Scrofani, J. Microtubule nucleation in mitosis by a Ran GTP-dependent protein complex / J. Scrofani, T. Sardon, S. Meunier, I. Vernos // *Curr. Biol.* – 2015. – Vol. 25. – P. 131–140.
474. Seals, D. F. The adaptor protein Tks5/Fish is required for podosome formation and function, and for the protease-driven invasion of cancer cells / D. F. Seals, E. F. Azucena Jr., I. Pass [et al.] // *Cancer Cell.* – 2005. – Vol. 7. – P. 155–165.
475. Seano, G. Podosomes and invadopodia: tools to breach vascular basement membrane / G. Seano, L. Primo // *Cell Cycle.* – 2015. – Vol. 14, № 9. – P. 1370–1374.
476. Senbanjo, L. T. CD44: a multifunctional cell surface adhesion receptor is a regulator of progression and metastasis of cancer cells / L. T. Senbanjo, M. A. Chellaiah // *Front. Cell Dev. Biol.* – 2017. – Vol. 5. – P. 18.
477. Shamas-Din, A. BH3-only proteins: orchestrators of apoptosis / A. Shamas-Din, H. Brahmabhatt, B. Leber, D. W. Andrews // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2011. – Vol. 1813. – P. 508–520.
478. Sherbet, G. V. Membrane fluidity and cancer metastasis / G. V. Sherbet // *Exp. Cell Biol.* – 1989. – Vol. 57. – P. 198–205.
479. Sherman, L. Hyaluronate receptors: key players in growth, differentiation, migration and tumor progression / L. Sherman, J. Sleeman, P. Herrlich, H. Ponta // *Curr. Opin. Cell Biol.* – 1994. – Vol. 6, № 5. – P. 726–33.
480. Shigeeda, W. Hyaluronic acid enhances cell migration and invasion via the YAP1/TAZ-RHAMM axis in malignant pleural mesothelioma / W. Shigeeda, M. Shibazaki, S. Yasuhira [et al.] // *Oncotarget.* – 2017. – Vol. 8, № 55. – P. 93729–93740.
481. Shigeishi, H. Expression of the hyaluronan receptor RHAMM in endometrial carcinomas suggests a role in tumour progression and metastasis / H. Shigeishi, K. Higashikawa, M. Takechi // *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* – 2003. – Vol. 129, № 3. – P. 161–164.
482. Shigeishi, H. Role of receptor for hyaluronan-mediated motility (RHAMM) in human head and neck cancers / H. Shigeishi, K. Higashikawa, M. Takechi // *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* – 2014. – Vol. 140, № 10. – P. 1629–1640.
483. Si, D. High expression of CD44 predicts a poor prognosis in glioblastomas / D. Si, F. Yin, J. Peng, G. Zhang // *Cancer Manag Res.* – 2020. – Vol. 12. – P. 769–775.
484. Silverman-Gavrila, R. Rear polarization of the microtubule-organizing center in neointimal smooth muscle cells depends on PKC $\alpha$ , ARPC5, and RHAMM / R. Silverman-Gavrila, L. Silverman-Gavrila, G. Hou [et al.] // *Am. J. Pathol.* – 2011. – Vol. 178, № 2. – P. 895–910.
485. Simpson, M. A. Hyaluronan and hyaluronidase in genitourinary tumors / M. A. Simpson, V. B. Lokeshwar // *Front. Biosci.* – 2008. – Vol. 13. – P. 5664–5680.

486. Simpson, M. A. Inhibition of prostate tumor cell hyaluronan synthesis impairs subcutaneous growth and vascularization in immunocompromised mice / M. A. Simpson, C. M. Wilson, J. B. McCarthy // *Am. J. Pathol.* – 2002. – Vol. 161. – P. 849–857.
487. Singh, J. K. Targeting CXCR1/2 significantly reduces breast cancer stem cell activity and increases the efficacy of inhibiting HER2 via HER2-dependent and -independent mechanisms / J. K. Singh, G. Farnie, N. J. Bundred [et al.] // *Clin. Cancer Res.* – 2013. – Vol. 19, № 3. – P. 643–656.
488. Singleton, P. A. Hyaluronan regulation of endothelial barrier function in cancer / P. A. Singleton // *Adv. Cancer Res.* – 2014. – Vol. 123. – P. 191–209.
489. Sironen, R. K. Hyaluronan in human malignancies / R. K. Sironen, M. Tammi, R. Tammi [et al.] // *Exp. Cell Res.* – 2011. – Vol. 31, № 4. – P. 383–391.
490. Skandalis, S. S. Intracellular hyaluronan: importance for cellular functions / S. S. Skandalis, T. Karalis, P. Heldin // *Semin. Cancer Biol.* – 2020. – Vol. 62. – P. 20–30.
491. Skiniotis, G. Modulation of kinesin binding by the C-termini of tubulin / G. Skiniotis, J. C. Cochran, J. Müller [et al.] // *EMBO J.* – 2004. – Vol. 23, № 5. – P. 989–999.
492. Smith, N. F. Pharmacogenetics of irinotecan metabolism and transport: an update / N. F. Smith, W. D. Figg, A. Sparreboom // *In Vitro.* – 2006. – Vol. 20. – P. 163–175.
493. Smith, C. A. The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death / C. A. Smith, T. Farrah, R. G. Goodwin // *Cell.* – 1994. – Vol. 76, № 6. – P. 959–962.
494. Smith, T. C. Novel interactors and a role for supervillin in early cytokinesis / T. C. Smith, Z. Fang, E. J. Luna // *Cytoskeleton (Hoboken).* – 2010. – Vol. 67, № 6. – P. 346–364.
495. Smith, T. C. Supervillin binding to myosin II and synergism with anillin are required for cytokinesis / T. C. Smith, P. C. Fridy, Y. Li [et al.] // *Mol. Biol. Cell.* – 2013. – Vol. 24, № 23. – P. 3603–3619.
496. Snauwaert, S. RHAMM/HMMR (CD168) is not an ideal target antigen for immunotherapy of acute myeloid leukemia / S. Snauwaert, S. Vanhee, G. Goetgeluk [et al.] // *Haematologica.* – 2012. – Vol. 97, № 10. – P. 1539–1547.
497. Snyder, E. L. Treatment of terminal peritoneal carcinomatosis by a transducible p53-activating peptide / E. L. Snyder, B. R. Meade, C. C. Saenz, S. F. Dowdy // *PLoS Biol.* – 2004. – Vol. 2. – P. E36.
498. Soballe, P. W. Experimental local therapy of human melanoma with lytic magainin peptides / P. W. Soballe, W. L. Maloy, M. L. Myrnga [et al.] // *Int. J. Cancer.* – 1995. – Vol. 60. – P. 280–284.
499. Sohr, S. RHAMM is differentially expressed in the cell cycle and downregulated by the tumor suppressor p53 / S. Sohr, K. Engeland // *Cell Cycle.* – 2008. – Vol. 7, № 21. – P. 3448–3460.
500. Sok, M. Cell membrane fluidity and prognosis of lung cancer / M. Sok, M. Sentjurs, M. [et al.] Schara // *Ann. Thorac Surg.* – 2002. – Vol. 73. – P. 1567–1571.
501. Solis, M. A. Hyaluronan Induces a Mitochondrial Functional Switch in Fast-Proliferating Human Mesenchymal Stem / M. A. Solis, Y. H. Wei, C. H. Chang [et al.] // *Int. J. Stem Cells.* – 2020. – Vol. 13, № 1. – P. 151–162.
502. Song, J. M. Hyaluronan-CD44/RHAMM interaction-dependent cell proliferation and survival in lung cancer cells / J. M. Song, J. Im, R. S. Nho [et al.] // *Mol. Carcinog.* – 2019. – Vol. 58, № 3. – P. 321–333.
503. Song, J. M. Triptolide suppresses the in vitro and in vivo growth of lung cancer cells by targeting hyaluronan-CD44/RHAMM signaling / J. M. Song, K. Molla, A. Anandharaj [et al.] // *Oncotarget.* – 2017. – Vol. 8, № 16. – P. 26927–26940.
504. Song, L. Regulated degradation of spindle assembly factors by the anaphase-promoting complex / L. Song, M. Rape // *Mol. Cell.* – 2010. – Vol. 38. – P. 369–382.
505. Srisailam, S. Crumpled structure of the custom hydrophobic lytic peptide cecropin B3 / S. Srisailam, T. K. Kumar, A. I. Arunkumar [et al.] // *Eur. J. Biochem.* – 2001. – Vol. 268. – P. 4278–4284.
506. Stangeland, B. Combined expressional analysis, bioinformatics and targeted proteomics identify new potential therapeutic targets in glioblastoma stem cells / B. Stangeland, A. A. Mughal, Z. Grieg [et al.] // *Oncotarget.* – 2015. – Vol. 6, № 28. – P. 26192–26215.

507. Stern, R. Hyaluronan catabolism: a new metabolic pathway / R. Stern // *Eur. J. Cell Biol.* – 2004. – Vol. 83, № 7. – P. 317–325.
508. Stern, R. Hyaluronidases: their genomics, structures, and mechanisms of action / R. Stern, M. J. Jedrzejewski // *Chem. Rev.* – 2006. – Vol. 106. – P. 818–839.
509. Sugahara, K. N. Coadministration of a tumor-penetrating peptide enhances the efficacy of cancer drugs / K. N. Sugahara, T. Teesalu, P. P. Karmali [et al.] // *Science.* – 2010. – Vol. 328. – P. 1031–1035.
510. Sugahara, K. N. Tissue-penetrating delivery of compounds and nanoparticles into tumors / K. N., Sugahara T. Teesalu, P. P. Karmali [et al.] // *Cancer Cell.* – 2009. – Vol. 16. – P. 510–520.
511. Sun, X. Peptide-based imaging agents for cancer detection / X. Sun, Y. Li, T. Liu, Z. Li [et al.] // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2017. – Vol. 110–111. – P. 38–51.
512. Suttman, H. Antimicrobial peptides of the Cecropin-family show potent antitumor activity against bladder cancer cells / H. Suttman, M. Retz, F. Paulsen [et al.] // *BMC. Urol.* – 2008. – Vol. 8. – P. 5.
513. Suzuki, M. Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization / M. Suzuki, R. J. Youle, N. Tjandra // *Cell.* – 2000. – Vol. 103. – P. 645–654.
514. Szeto, H. H. Mitochondria-targeted peptide antioxidants: novel neuroprotective agents / H. H. Szeto // *AAPS J.* – 2006. – Vol. 8. – P. E521–E531.
515. Tabarkiewicz, J. Definition of a target for immunotherapy and results of the first Peptide vaccination study in chronic lymphocytic leukemia / J. Tabarkiewicz, K. Giannopoulos // *Transplant Proc.* – 2010. – Vol. 42, № 8. – P. 3293–3296.
516. Takara, K. Design of a dual-ligand system using a specific ligand and cell penetrating peptide, resulting in a synergistic effect on selectivity and cellular uptake / K. Takara, H. Hatakeyama, N. Ohga [et al.] // *Int. J. Pharm.* – 2010. – Vol. 396. – P. 143–148.
517. Takechi, Y. Comparative study on the interaction of cell-penetrating polycationic polymers with lipid membranes / Y. Takechi, H. Tanaka, H. Kitayama [et al.] // *Chem. Phys. Lipids.* – 2012. – Vol. 165. – P. 51–58.
518. Takeda, M. Ligand-induced structural changes of the CD44 hyaluronan-binding domain revealed by NMR / M. Takeda, S. Ogino, R. Umemoto [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2006. – Vol. 281, № 52. – P. 40089–40095.
519. Tammi, R. H. Hyaluronan in human tumors: pathobiological and prognostic messages from cell-associated and stromal hyaluronan / R. H. Tammi, A. Kultti, V. M. Kosma [et al.] // *Semin. Cancer Biol.* – 2008. – Vol. 18, № 4. – P. 288–295.
520. Tan, J. X. HYAL1 overexpression is correlated with the malignant behavior of human breast cancer / J. X. Tan, X. Y. Wang, H. Y. Li [et al.] // *Int. J. Cancer.* – 2011. – Vol. 128, № 6. – P. 1303–1315.
521. Tan, J. X. Upregulation of HYAL1 expression in breast cancer promoted tumor cell proliferation, migration, invasion and angiogenesis / J. X. Tan, X. Y. Wang, X. L. Su [et al.] // *PLoS One.* – 2011. – V. 6. – P. e22836.
522. Tangutoori, S. PARP inhibitors: A new era of targeted therapy / S. Tangutoori, P. Baldwin, S. Sridhar // *Maturitas.* – 2015. – Vol. 81, № 1. – P. 5–9.
523. Tanner, J. D. The biological and biophysical properties of the spider peptide gomesin / J. D. Tanner, E. Deplazes, R. L. Mancera // *Molecules.* – 2018. – Vol. 23, № 7. – pii: E1733.
524. Tartaglia, L. Two TNF receptors / L. Tartaglia, D. V. Goeddel // *Immunol. Today.* – 1992. – Vol. 13, № 5. – P. 151–153.
525. Teesalu, T. Mapping of vascular ZIP codes by phage display / T. Teesalu, K. N. Sugahara, E. Ruoslahti // *Methods Enzymol.* – 2012. – Vol. 503. – P. 35–56.
526. Teicher, B. A. *Anticancer Drug Development Guide. Preclinical screening, clinical trials, and approval* / B. A. Teicher, P. A. Andrews. – Second ed. – Totowa, New Jersey : Humana Press, 2004. – 250 p.
527. Thayer, A. M. Improving peptides / A. M. Thayer // *Chemical and Engineering News.* – 2011. – Vol. 89, № 22. – P. 13–20.
528. Thornberry, N. A. A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. functional relationships established for key mediators of apoptosis /

- N. A. Thornberry, T. A. Rano, E. P. Peterson [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1997. – Vol. 272, № 29. – P. 17907–17911.
529. Tian, X. High-molecular-mass hyaluronan mediates the cancer resistance of the naked mole rat / X. Tian, J. Azpurua, C. Hine [et al.] // *Nature.* – 2013. – Vol. 499, № 7458. – P. 346–349.
530. Tijink, B. M. A phase I dose escalation study with anti-CD44v6 bivatuzumab mertansine in patients with incurable squamous cell carcinoma of the head and neck or esophagus / B. M. Tijink, J. Buter, R. de Bree [et al.] // *Clin. Cancer Res.* – 2006. – Vol. 12. – P. 6064–6072.
531. Tolg, C. RHAMM promotes interphase microtubule instability and mitotic spindle integrity through MEK1/ERK1/2 activity / C. Tolg, S. R. Hamilton, L. Morningstar [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2010. – Vol. 285, № 34. – P. 26461–26474.
532. Tolg, C. Rhamm-/- fibroblasts are defective in CD44-mediated ERK1,2 mitogenic signaling, leading to defective skin wound repair / C. Tolg, S. R. Hamilton, K. A. Nakrieko [et al.] // *J. Cell Biol.* – 2006. – Vol. 175. – P. 1017–1028.
533. Tolg, C. A RHAMM mimetic peptide blocks hyaluronan signaling and reduces inflammation and fibrogenesis in excisional skin wounds / C. Tolg, S. R. Hamilton, E. Zalinska [et al.] // *Am. J. Pathol.* – 2012. – Vol. 181, № 4. – P. 1250–1270.
534. Tolg, C. Cell-specific expression of the transcriptional regulator RHAMM provides a timing mechanism that controls appropriate wound re-epithelialization / C., Tolg M. Liu, K Cousteils. [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2020. – Vol. 295, № 16. – P. 5427–5448.
535. Tolg, C. Hyaluronan and RHAMM in wound repair and the “cancerization” of stromal tissues / C. Tolg, J. B. McCarthy, A. Yazdani, E. A. Turley // *Biomed. Res. Int.* – 2014. – Vol. 2014. – P. 103923.
536. Toole, B. P. Hyaluronan: a constitutive regulator of chemoresistance and malignancy in cancer cells / B. P. Toole, M. G. H. Slomiany // *Semin. Cancer Biol.* – 2008. – Vol. 18. – P. 244–250.
537. Toole, B. P. Hyaluronan oligosaccharides as a potential anticancer therapeutic / B. P. Toole, S. Ghatak, S. Misra // *Curr. Pharm. Biotechnol.* – 2008. – Vol. 9. – P. 249–252.
538. Toole, B. P. Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue // B. P. Toole // *Nat. Rev. Cancer.* – 2004. – Vol. 4. – P. 528–539.
539. Toole, B. P. Hyaluronan-CD44 interactions in cancer: paradoxes and possibilities / B. P. Toole // *Clin. Cancer Res.* – 2009. – Vol. 15. – P. 7462–7468.
540. Toole, B. P., Hyaluronan and tumor growth / B. P. Toole V. C. Hascall // *Am. J. Pathol.* – 2002. – Vol. 161, № 3. – P. 745–747.
541. Torchilin, V. P. Tat peptide-mediated intracellular delivery of pharmaceutical nanocarriers / V. P. Torchilin // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2008. – Vol. 60. – P. 548–558.
542. Towbin, H. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications / H. Towbin, T. Staehelin, J. Gordon // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* – 1979. – Vol. 76, № 9. – P. 4350–4354.
543. Turley, E. A. RHAMM and CD44 peptides-analytic tools and potential drugs / E. A. Turley, D. Naor // *Front Biosci.* – 2010. – Vol. 17. – P. 1775–1794.
544. Turley, E. A. Hyaluronic acid stimulates protein kinase activity in intact cells and in an isolated protein complex / E. A. Turley // *J. Biol. Chem.* – 1989. – Vol. 264. – P. 8951–8955.
545. Turley, E. A. The control of adrenocortical cyto differentiation by extracellular matrix / E. A. Turley // *Differentiation.* – 1980. – Vol. 17. – P. 93–103.
546. Turley, E. A. Rhamm, a co-receptor and its interactions with other receptors in cancer cell motility and the identification of cancer progenitor cell populations / E. A. Turley, M. J. Bissell, F. Winnik. – International Patent US 20100062000 A16. – 2009.
547. Turley, E. A. Glycosaminoglycan production by murine melanoma variants in vivo and in vitro / M. Tretiak // *Cancer Res.* – 1985. – Vol. 45. – P. 5098–5105.
548. Turley, E. A. Hyaluronan and cell locomotion / E. A. Turley // *Cancer Metastasis Rev.* – 1992. – Vol. 11, № 1. – P. 21–30.

549. Tzellos, T. Nodular basal cell carcinoma is associated with increased hyaluronan homeostasis / T., Tzellos A. Kyrgidis, K. Vahtsevanos [et al.] // *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* – 2010. – Vol. 25. – P. 679–687.
550. Tzortzakakis, A. Visual evaluation and differentiation of renal oncocytomas from renal cell carcinomas by means of <sup>99m</sup>Tc-sestamibi SPECT/CT / A. Tzortzakakis, O Gustafsson., M. Karlsson [et al.] // *EJNMMI Res.* – 2017. – Vol. 7. – P. 1–29.
551. Ukhanova, T. M. Therapeutic dose characteristics of the chimeric peptide MM-D37K when administered parenterally to BALB / C NUDE mice with human colorectal cancer HCT-116 / T. M. Ukhanova, E. A. Kulinich, V. K. Kudinova // *Russian Biotherapeutic Journal.* – 2017. – Vol. 16, № 2. – P. 36–41.
552. Underhill, C. B. Binding of hyaluronate to the surface of cultured cells / C. B. Underhill, and B. P. Toole // *J. Cell Biol.* – 1979. – Vol. 82. – P. 475–484.
553. Urakawa, H. Inhibition of hyaluronan synthesis in breast cancer cells by 4-methylumbelliferone suppresses tumorigenicity in vitro and metastatic lesions of bone in vivo / H. Urakawa, Y. Nishida, J. Wasa [et al.] // *Int. J. Cancer.* – 2012. – Vol. 130, № 2. – P. 454–466.
554. Utsugi, T. Elevated expression of phosphatidylserine in the outer membrane leaflet of human tumor cells and recognition by activated human blood monocytes / T. Utsugi, A. J. Schroit, J. Connor [et al.] // *Cancer Res.* – 1991. – Vol. 51. – P. 3062–3066.
555. Van Delft, M. F. The BH3 mimetic ABT-737 targets selective Bcl-2 proteins and efficiently induces apoptosis via Bak/Bax if Mcl-1 is neutralized / M. F. Van Delft, A. H. Wei, K. D. Mason [et al.] // *Cancer Cell.* – 2006. – Vol. 10. – P. 389–399.
556. Van Luijn, M. M. Impaired antigen presentation in neoplasia: basic mechanisms and implications for acute myeloid leukemia / M. M. Van Luijn, W. van den Ancker, M. E. Chamuleau [et al.] // *Immunotherapy.* – 2010. – Vol. 2. – P. 85–97.
557. Vasconcelos, L. Therapeutic potential of cell-penetrating peptides / L. Vasconcelos, K. Parn, U. Langel // *Ther. Deliv.* – 2013. – Vol. 4. – P. 573–591.
558. Vaux, D. L. Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells / D. L. Vaux, S., Cory J. M. Adams // *Nature.* – 1988. – Vol. 335. – P. 440–442.
559. Veillat, V. Podosomes: Multipurpose organelles? / V. Veillat, P. Spuul, T. Daubon [et al.] // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* – 2015. – Vol. 65. – P. 52–60.
560. Veiman, K. L. PepFect14 peptide vector for efficient gene delivery in cell cultures / K. L. Veiman, I. Mager, K. Ezzat [et al.] // *Mol. Pharm.* – 2013. – Vol. 10, № 11. – P. 199–210.
561. Veiseh, M. Hyaluronan metabolism in remodeling extracellular matrix: probes for imaging and therapy of breast cancer / M. Veiseh, E. A. Turley // *Integr. Biol. (Camb).* – 2011. – Vol. 3, № 4. – P. 304–315.
562. Veiseh, M. Imaging of homeostatic, neoplastic, and injured tissues by HA-base probes / M. Veiseh, D. Breadner, J. Ma [et al.] // *Biomacromolecules.* – 2012. – Vol. 13, № 1. – P. 12–22.
563. Veiseh, M. Cellular heterogeneity profiling by hyaluronan probes reveals an invasive but slow-growing breast tumor subset / M. Veiseh, D. Kwona, A. Borowsky [et al.] // *PNAS.* – 2014. – P. 1731–1739.
564. Veiseh, M. Uncovering the dual role of RHAMM as an HA receptor and a regulator of CD44 expression in RHAMM-expressing mesenchymal progenitor cells / M. Veiseh, S. J. Leith, C. Tolg [et al.] // *Front. Cell Dev. Biol.* – 2015. – Vol. 3. – P. 63.
565. Veloria, J. R. Novel cell-penetrating-amyloid peptide conjugates preferentially kill cancer cells / J. R. Veloria, L. Chen, L. Li, G. A. M. Breen [et al.] // *Med. chem. comm.* – 2017. – Vol. 9, № 1. – P. 121–30.
566. Verdurmen, W. P. Preferential uptake of L- versus D-amino acid cell-penetrating peptides in a cell type-dependent manner / W. P. Verdurmen, P. H. Bovee-Geurts, P. Wadhvani [et al.] // *Chem. Biol.* – 2011. – Vol. 18. – P. 1000–1010.
567. Vicencio, J. M. Senescence, apoptosis or autophagy? When a damaged cell must decide its path-a mini-review / J. M. Vicencio, L. Galluzzi, N. Tajeddine [et al.] // *Gerontology.* – 2008. – Vol. 54, № 2. – P. 92–99.

568. Viel-Ronen, S. Glypican-3 is overexpressed in lung squamous cell carcinoma, but not in adenocarcinoma / S. Viel-Ronen, S. K. Lau, M. Pintilie [et al.] // *Mod. Pathol.* – 2008. – Vol. 21. – P. 817–825.

569. Villegas-Ruíz, V. A case of cervical cancer expressed three mRNA variant of hyaluronan-mediated motility receptor / V. Villegas-Ruíz, M. Salcedo, A. Zentella-Dehesa [et al.] // *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* – 2014. – Vol. 7, № 5. – P. 2256–2264.

570. Vives, E. A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus / E. Vives, P. Brodin, B. Lebleu // *J. Biol. Chem.* – 1997. – Vol. 272. – P. 16010–16017.

571. Vives, E. Cell-penetrating and cell-targeting peptides in drug delivery / E. Vives, J. Schmidt, A. Pelegrin // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2008. – Vol. 1786, № 2. – P. 126–138.

572. Volpi, N. Role, metabolism, chemical modifications and applications of hyaluronan / N. Volpi, J. Schiller, R. Stern, L. Soltés // *Curr. Med. Chem.* – 2009. – Vol. 16, № 14. – P. 1718–1745.

573. Walensky, L. D. Activation of apoptosis in vivo by a hydrocarbon-stapled BH3 helix / L. D. Walensky, A. L. Kung, I. Escher [et al.] // *Science.* – 2004. – Vol. 305. – P. 1466–1470.

574. Wang, C. The overexpression of RHAMM, a hyaluronan-binding protein that regulates ras signaling, correlates with overexpression of mitogen-activated protein kinase and is a significant parameter in breast cancer progression / C. Wang, A. D. Thor, D. H. Moore [et al.] // *Clin. Cancer Res.* – 1998. – Vol. 4. – P. 567–576.

575. Wang, D. Expression of the receptor for hyaluronic acid mediated motility (RHAMM) is associated with poor prognosis and metastasis in non-small cell lung carcinoma / D. Wang, N. Narula, S. Azzopardi [et al.] // *Oncotarget.* – 2016. – Vol. 7, № 26. – P. 39957–39969.

576. Wang, Y. Perspectives of SEREX-defined antigens in diagnosis and immunotherapy for gastric cancer / Y. Wang, Q. Gu, B. Liu, Z. Zhu // *Cancer Biol. Ther.* – 2004. – Vol. 3. – P. 806–811.

577. Wang, Y. Ephrin B2/EphB4 mediates the actions of IGF-I signaling in regulating endochondral bone formation / Y. Wang, A. Menendez, C. Fong [et al.] // *Bone Miner. Res.* – 2014. – Vol. 29. – P. 1900–1913.

578. Wang, Z. APD: the antimicrobial peptide database / Z. Wang, G. Wang // *Nucleic Acids Res.* – 2004. – Vol. 32. – P. D590–D592.

579. Wang, Z. Interplay of mevalonate and Hippo pathways regulates RHAMM transcription via YAP to modulate breast cancer cell motility / Z. Wang, Y. Wu, H. Wang [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2014. – Vol. 111, № 1. – P. 89–98.

580. Warso, M. A. A first-in-class, first-in-human, phase I trial of p28, a non-HDM2-mediated peptide inhibitor of p53 ubiquitination in patients with advanced solid tumours / M. A. Warso, J. M. Richards, D. Mehta [et al.] // *Br. J. Cancer.* – 2013. – Vol. 108. – P. 1061–1070.

581. Watt, H. L. Biology of somatostatin in breast cancer / H. L. Watt, G. Kharmate, U. Kumar // *Mol. Cell Endocrinol.* – 2008. – Vol. 286, № 1-2. – P. 251–261.

582. Weaver, A. M. Invadopodia: specialized cell structures for cancer invasion / A. M. Weaver // *Clin. Exp. Metastasis.* – 2006. – Vol. 23. – P. 97–105.

583. Weber, J. S. The clinical utility of cytotoxic T lymphocyte antigen 4 abrogation by human antibodies / J. S. Weber // *Melanoma Res.* – 2006. – Vol. 16. – P. 379–383.

584. Weigel, P. H. Hyaluronan Synthase: The mechanism of initiation at the reducing end and a pendulum model for polysaccharide translocation to the cell exterior / P. H. Weigel // *Int. J. Cell Biol.* – 2015. – Vol. 2015. – P. 367579.

585. Weissleder, R. Scaling down imaging: molecular mapping of cancer in mice / R. Weissleder // *Nat. Rev. Cancer.* – 2002. – Vol. 2. – P. 11–18.

586. Welch, H. G. The heterogeneity of cancer / H. G. Welch // *Breast Cancer Res Treat.* – 2018. – Vol. 169, № 2. – P. 207–208.

587. West, D. C. Hyaluronan and angiogenesis / D. C. West, S. Kumar // *Ciba Found. Symp.* – 1989. – Vol. 143. – P. 187–201.

588. Whatcott, C. J. Targeting the tumor microenvironment in cancer: why hyaluronidase deserves a second look / C. J. Whatcott, H. Han, R. G. Posner [et al.] // *Cancer Discov.* – 2011. – Vol. 1. – P. 291–296.
589. Wieser, G. Positron emission tomography (PET) imaging of prostate cancer with a gastrin releasing peptide receptor antagonist – from mice to men / G. Wieser, R. Mansi, A. L. Grosu [et al.] // *Theranostics.* – 2014. – Vol. 4, № 4. – P. 412–419.
590. Wight, T. N. Provisional matrix: A role for versican and hyaluronan / T. N. Wight // *Matrix Biol.* – 2017. – Vol. 60–61. – P. 38–56.
591. Wiley, S. R. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis / S. R. Wiley, K. Schooley, P. J. Smolak [et al.] // *Immunity.* – 1995. – Vol. 3, № 6. – P. 673–82.
592. Wilson, W. H. Navitoclax, a targeted high-affinity inhibitor of BCL-2, in lymphoid malignancies: a phase 1 dose-escalation study of safety, pharmacokinetics, pharmacodynamics, and antitumour activity / W. H. Wilson, O. A. O'Connor, M. S. Czuczman [et al.] // *Lancet. Oncol.* – 2010. – Vol. 11. – P. 1149–1159.
593. Witschen, P. M. Tumor cell associated hyaluronan-CD44 signaling promotes pro-tumor inflammation in breast cancer / P. M. Witschen, T. S. Chaffee, N. J. Brady [et al.] // *Cancers (Basel).* – 2020. – Vol. 12, № 5. – P. 1325.
594. Wittmann, T. Localization of the kinesin-like protein Xklp2 to spindle poles requires a leucine zipper, a microtubule-associated protein, and dynein / T. Wittmann, H. Boleti, C. Antony [et al.] // *J. Cell Biol.* – 1998. – Vol. 143. – P. 673–685.
595. Wolf, K. J. Hyaluronic Acid: incorporating the bio into the material / K. J. Wolf, S. Kumar // *ACS Biomater Sci Eng.* – 2019. – Vol. 5, № 8. – P. 3753–3765.
596. Wong, A. N. M. The advantages and challenges of using FDG PET/CT for response assessment in melanoma in the era of targeted agents and immunotherapy / A. N. M. Wong, G. A. McArthur, M. S. Hofman, R. J. Hicks // *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* – 2017. – Vol. 44 (suppl. 1). – P. 67–77.
597. Wong, J. W. H. Analysis of disulfide bonds in protein structures / J. W. H. Wong, P. J. Hogg // *J. Thromb. Haemost.* – 2010. – P. 2345–2345.
598. Wu, M. A novel role of low molecular weight hyaluronan in breast cancer metastasis / M. Wu, M. Cao, Y. He [et al.] // *FASEB. J.* – 2015. – Vol. 29, № 4. – P. 1290–1298.
599. Wu, R. L. Hyaluronic acid in digestive cancers / R. L. Wu, L. Huang, H. C. Zhao, X. P. Geng // *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* – 2017. – Vol. 143. – P. 1–16.
600. Wu, R. L. Hyaluronic acid-CD44 interactions promote BMP4/7-dependent Id1/3 expression in melanoma cells / R. L. Wu, G. Sedlmeier, L. Kyjacova [et al.] // *Sci. Rep.* – 2018. – Vol. 8, № 1. – P. 14913.
601. Wyllie, A. H. Cell death: the significance of apoptosis / A. H. Wyllie, J. F. Kerr, A. R. Currie // *Int. Rev. Cytol.* – 1980. – Vol. 68. – P. 251–306.
602. Xia, Z. Total synthesis of dendroamide A, a novel cyclic peptide that reverses multiple drug resistance / Z. Xia, C. D. Smith // *J. Org. Chem.* – 2001. – Vol. 66, № 10. – P. 3459–3466.
603. Xiang, Y. Improved anticancer efficacy of doxorubicin mediated by human-derived cell-penetrating peptide dNP2 / Y. Xiang, W. Shan, Y. Huang // *Int. J. Pharm.* – 2018. – Vol. 551, № 1-2. – P. 14–22.
604. Xu, L. Prognostic significance of several biomarkers in epithelial ovarian cancer: a meta-analysis of published studies / L. Xu, J. Cai, Q. Yang [et al.] // *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* – 2013. – Vol. 139. – P. 1257–1277.
605. Xu, X. M. A peptide with three hyaluronan binding motifs inhibits tumor growth and induces apoptosis / X. M. Xu, Y. Chen, J. Chen [et al.] // *Cancer Res.* – 2003. – Vol. 63. – P. 5685–5690.
606. Yamada, T. A peptide fragment of azurin induces a p53-mediated cell cycle arrest in human breast cancer cells / T. Yamada, R. R. Mehta, F. Lekmine [et al.] // *Mol. Cancer Ther.* – 2009. – Vol. 8, № 10. – P. 2947–2958.

607. Yamaguchi, H. Molecular mechanisms of invadopodium formation: the role of the N-WASP-Arp2/3 complex pathway and cofilin / H. Yamaguchi, M. Lorenz, S. Kempniak [et al.] // *J. Cell. Biol.* – 2005. – Vol. 168. – P. 441–452.
608. Yamano, Y. Hyaluronan-mediated motility: a target in oral squamous cell carcinoma / Y. Yamano, K. Uzawa, K. Shinozuka [et al.] // *Int. J. Oncol.* – 2008. – Vol. 32, № 5. – P. 1001–1009.
609. Yang, B. Identification of a novel heparin binding domain in RHAMM and evidence that it modifies HA mediated locomotion of ras-transformed cells / B. Yang, C. L. Hall, B. L. Yang [et al.] // *J. Cell. Biochem.* – 1994. – Vol. 56. – P. 455–468.
610. Yang, B. Identification of a common hyaluronan binding motif in the hyaluronan binding proteins RHAMM, CD44 and link protein / B. Yang, B. L. Yang, R. C. Savani, E. A. Turley // *EMBO. J.* – 1994. – Vol. 13, № 2. – P. 286–296.
611. Yang, B. Identification of two hyaluronan-binding domains in the hyaluronan receptor RHAMM / B. Yang, L. Zhang, E. A. Turley // *J. Biol. Chem.* – 1993. – Vol. 268, № 12. – P. 8617–8623.
612. Yang, C. Redox responsive hyaluronic acid nanogels for treating RHAMM (CD168) over-expressive cancer, both primary and metastatic tumors / C. Yang, C. Li, P. Zhang [et al.] // *Theranostics.* – 2017. – Vol. 7, № 6. – P. 1719–1734.
613. Yang, H. S. Antitumor and anti-angiogenesis immunity induced by CR-SEREX-identified Xenopus RHAMM / H. S. Yang, D. M. Zhang, H. X. Deng [et al.] // *Cancer Sci.* – 2010. – Vol. 101. – P. 862–868.
614. Yang, M. F-labeled GRPR agonists and antagonists: a comparative study in prostate cancer imaging / M. Yang, H. Gao, Y. Zhou [et al.] // *Theranostics.* – 2011. – Vol. 1. – P. 220–229.
615. Yang, Y. Synthesis and monkey-PET study of (R)- and (S)-18F-labeled 2-arylbenzoheterocyclic derivatives as amyloid probes with distinctive in vivo kinetics / Y. Yang, X. Wang, H. Yang [et al.] // *Mol. Pharm.* – 2016. – Vol. 13. – P. 3852–3863.
616. Ye, F. A peptide targeted contrast agent specific to fibrin-fibronectin complexes for cancer molecular imaging with MRI / F. Ye, X. Wu, E. K. Jeong [et al.] // *Bioconjug. Chem.* – 2008. – Vol. 19. – P. 2300–2303.
617. Ye, S. TGF $\beta$  and hippo pathways cooperate to enhance sarcomagenesis and metastasis through the hyaluronan-mediated motility receptor (HMMR) / S. Ye., Y. Liu, A. M. Fuller [et al.] // *Mol. Cancer Res.* – 2020. – Vol. 18, № 4. – P. 560–573.
618. Yecies, D. Acquired resistance to ABT-737 in lymphoma cells that up-regulate Mcl-1 and BFL-1 / D. Yecies, N. E. Carlson, J. Deng, A. Letai // *Blood.* – 2010. – Vol. 115. – P. 3304–3313.
619. Yi-Chieh, N. D. Receptor for hyaluronan-mediated motility isoform B promotes liver metastasis in a mouse model of multistep tumorigenesis and a tail vein assay for metastasis / N. D. Yi-Chieh, C. Chen-Kung, V. Harold // *Неоплазия.* – 2009. – Vol. 11. – P. 956–963.
620. Yin, H. iRGD as a tumor penetrating peptide for cancer therapy / H. Yin, J. Yang, Q. Zhang [et al.] // *Mol. Med. Rep.* – 2017. – Vol. 15, № 5. – P. 2925–2930.
621. Yoshida, K. Interaction of pleurocidin and its analogs with phospholipid membrane and their antibacterial activity / K. Yoshida, Y. Mukai, T. Niidome [et al.] // *J. Pept. Res.* – 2001. – Vol. 57. – P. 119–126.
622. Yuan, J. Iodine-125 labeled australian frog tree host-defense peptides caerin 1.1 and 1.9 better inhibit human breast cancer cells growth than the unlabeled peptides. 125I-caerin 1.9 may better be used for the treatment of breast cancer / J. Yuan, X. You, G. Ni [et al.] // *Hell. J. Nucl. Med.* – 2018. – Vol. 21, № 2. – P. 115–120.
623. Yuzhalin, A. E. Dynamic matrisome: ECM remodeling factors licensing cancer progression and metastasis / A. E. Yuzhalin, S. Y. Lim, A. G. Kutikhin, A. Gordon-Weeks // *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer.* – 2018. – Vol. 1870, № 2. – P. 207–228.
624. Zainodini, N. Nisin induces cytotoxicity and apoptosis in human astrocytoma cell line (SW1088) / N. Zainodini, G. Hassanshahi, M. Hajizadeh [et al.] // *Asian. Pac. J. Cancer Prev.* – 2018. – Vol. 19, № 8. – P. 2217–2222.

625. Zasloff, M. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor / M. Zasloff // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1987. – Vol. 84. – P. 5449–5453.
626. Zhang, C. Preclinical melanoma imaging with <sup>68</sup>Ga-labeled  $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone derivatives using PET / C. Zhang, Z. Zhang, K. S. Lin [et al.] // *Theranostics.* – 2017. – Vol. 7, № 4. – P. 805–813.
627. Zhang, L. L. Hyaluronan on the surface of tumor cells is correlated with metastatic behavior / L. Zhang, C. B. Underhill, L. Chen // *Cancer Res.* – 1995. – Vol. 55. – P. 428–433.
628. Zhang, P. Identification of genetic loci that control mammary tumor susceptibility through the host microenvironment / P. Zhang, A. Lo, Y. Huang [et al.] // *Sci. Rep.* – 2015. – Vol. 5. – P. 8919.
629. Zhang, S. The hyaluronan receptor RHAMM regulates extracellular-regulated kinase / S. Zhang, M. C. Chang, D. Zylka [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1998. – Vol. 273. – P. 11342–11348.
630. Zhang, T. T. LAH4 enhances CD8<sup>+</sup> T cell immunity of protein/peptide-based vaccines / T. T. Zhang, T. H. Kang, B. Ma [et al.] // *Vaccine.* – 2012. – Vol. 30. – P. 784–793.
631. Zhang, X. Novel small peptides derived from VEGF125-136: potential drugs for radioactive diagnosis and therapy in A549 tumor-bearing nude mice / X. Zhang, S. Feng J. Liu [et al.] // *Sci. Rep.* – 2017. – Vol. 7, № 1. – P. 4278.
632. Zhang X. X., Eden H. S., Chen X. Peptides in cancer nanomedicine: drug carriers, targeting ligands and protease substrates / X. X. Zhang, H. S. Eden, X. Chen // *J. Control Release.* – 2012. – Vol. 159, № 1. – P. 2–13.
633. Zhang, J. G. The dendritic cell receptor Clec9A binds damaged cells via exposed actin filaments / J. G. Zhang, P. E. Czabotar, A. N. Policheni [et al.] // *Immunity.* – 2010. – Vol. 36. – P. 646–657.
634. Zhou, H. High EGFR-1 inside-out activated inflammation-induced motility through SLC2A1-CCNB2-HMMR-KIF11-NUSAP1-PRC1-UBE2C / H. Zhou, L. Wang, J. Huang [et al.] // *J. Cancer.* – 2015. – Vol. 6, № 6. – P. 519–524.
635. Zhu, H. The role of the hyaluronan receptor CD44 in mesenchymal stem cell migration in the extracellular matrix / H. Zhu, N. Mitsuhashi, A. Klein [et al.] // *Stem Cells.* – 2006. – Vol. 24, № 4. – P.928–935.
636. Ziebell, M. R. Interactions of peptide mimics of hyaluronic acid with the receptor for hyaluronan mediated motility (RHAMM) / M. R. Ziebell, G. D. Prestwich // *J. Comput. Aided Mol. Des.* – 2004. – Vol. 18, № 10. – P. 597–614.
637. Ziebell, M. R. Peptides that mimic glycosaminoglycans: high-affinity ligands for a hyaluronan binding domain / M. R. Ziebell, Z. G. Zhao, B. Luo [et al.] // *Chem. Biol.* – 2001. – Vol. 8. – P. 1081–1094.
638. Zlobec, I. Two-marker protein profile predicts poor prognosis in patients with early rectal cancer / I. Zlobec, K. Baker, L. Terracciano [et al.]. // *Br. J. Cancer.* – 2008. – Vol. 99. – P. 1712–1717.
639. Zwaal, R. F. Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells / R. F. Zwaal, A. J. Schroit // *Blood.* – 1997. – Vol. 89. – P. 1121–1132.

**БЛАГОДАРНОСТИ**

В первую очередь, выражаю благодарность своему научному консультанту, доктору биологических наук Топунову А. Ф. за помощь и консультации в написании данной работы.

Благодарю профессора Тюрли Е., PhD и профессора Лют Л., PhD Лондонского научного центра (London Health Science Center, г. Лондон, Онтарио, Канада) за помощь в проведении научного исследования, научного сотрудника Эсгуэрра К. за синтез пептидов.

Выражаю благодарность профессору Эверс А., PhD (Вашингтонский университет в г. Сент-Луисе, Миссури, США) за помощь в проведении исследования по масс-спектрометрическому анализу тубулина на первых этапах выполнения работы.

Выражаю благодарность в. н. с., д. б. н. Шушанову С. С. (ФГБУ «Российский онкологический научный центр имени Н.Н. Блохина» Минздрав РФ) за консультации при подготовке статей к публикации.

Выражаю благодарность коллективу ОКХиБП ИПХФ РАН за помощь и консультации при публикации статей.