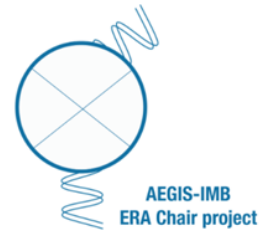




Institute of Molecular Biology
„Rumen Tsanev“



БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ

ИНСТИТУТ ПО МОЛЕКУЛЯРНА БИОЛОГИЯ “АКАДЕМИК РУМЕН ЦАНЕВ”

СЕКЦИЯ „РЕГУЛАЦИЯ НА ГЕННАТА АКТИВНОСТ“

**Синергично индуциране на секреция на извънклетъчни везикули и ДНК от
автофагични инхибитори и ДНК-увреждащи агенти**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертация за присъждане на образователна и научна степен „Доктор“

на

Александър Емилов Александров д.м.

Научен ръководител: Доц. д-р Димитър Илиев

Използвани съкращения:

AA – Акриламид

ALIX - ALG-2-interacting protein X

ATM – ATM serine/threonine kinase или Ataxia-telangiectasia mutated

ATMi – ATM инхибитор

Baf A – Bafilomycin A1

BFA – Brefeldin A

BSA – Говежди серумен албумин

CHQ – Хлорохин

CYC-1 – Cytochrome C1

DAPI – 4',6-diamidino-2-phenylindole

DDR – DNA damage response

DLS – Dynamic Light Scattering

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO – Диметил сулфоксид

DNase I – Деоксирибонуклеаза I

dsDSA – Двойноверижна ДНК

DTT – Dithiorthreitol

ESCRT – Endosomal Sorting Complexes Required for Transport

EV – Извънклетъчни везикули

FACS – Флуоресцентно-активирано клетъчно сортиране

FBS – Фетален говежди серум

HRP – Horseradish peroxidase

LAMP1 – Lysosomal-associated membrane protein 1

LC3 – Microtubule-associated protein light chain 3

LEV – Големи извънклетъчни везикули

MGMT – O6-Метилгуанин-ДНК Метилтрансфераза

MVE – Мулти-везикуларна ендозома

PBS – Фосфатно-буфериран физиологичен разтвор

PEG – Полиетиленгликол

PI – Пропидиев йодит

PVDF – Поливинилидендифлуорид

SDS – Натриев додецилсулфат

SDS-PAGE – Натриев додецилсулфат-полиакриламидна гел електрофореза

SEV – Малки извънклетъчни везикули

SN – Супернатанта

TBS – Трис буферен разтвор

TMZ – Темозоломид

TX-100 – Тритон X-100

WCL – Клетъчни лизати

ИКВ – Извънклетъчни везикули

НК – Нуклеинови киселини

Съдържание:

Въведение.....	1
Цел.....	2
Задачи.....	2
Материали и методи.....	3
Клетъчни култури.....	3
Реагенти.....	3
Първични антители.....	3
Анализ на клетъчна преживяемост.....	4
Изоляция на извънклетъчни везикули.....	4
Имуноблотинг.....	5
DLS (Dynamic Light Scattering) анализ.....	6
Флуоресцентна микроскопия.....	6
Анализ на извънклетъчни нуклеинови киселини.....	6
Алкален кометен анализ.....	8
Резултати.....	9
CHQ значително повишава цитотоксичния ефект на TMZ срещу TMZ-резистентни клетки, но не и срещу TMZ-чувствителни клетки.....	9
TMZ и CHQ синергично индуцират секреция на ИКВ, съдържащи автофагични маркери и caveolin-1 в култури от U87-MG.....	11
TMZ и CHQ синергично индуцират секреция на ИКВ, съдържащи автофагични маркери и caveolin-1 в култури от U138-MG.....	13
CHQ предизвиква натрупване на LC3B в лумена на CD63 позитивни амфизоми/автолизосоми; LC3B и caveolin-1 колокализират в индуцираните от CHQ агрегати от LC3B.....	15
TMZ повишава индуцираната от Bafilomycin A1 секреция на ИКВ.....	17
CHQ и етопозид синергично индуцират секреция на автофагични маркери във фракцията на големи ИКВ.....	19
CHQ усилва предизвикания от TMZ отговор към увредена ДНК, но не увеличава съдържанието на увредена ДНК в U87-MG клетки.....	20
CHQ и TMZ синергично индуцират секреция на извънклетъчни нуклеинови киселини в култури от U87-MG клетки.....	22
ATMi предизвикват натрупване на LC3B-II и p62 в HeLa Kyoto клетки.....	24
KU-60019 предизвиква натрупване и уголемяване на лизосоми в HeLa Kyoto клетки при отсъствие на серум.....	27
KU-60019 (5 μ M) не повлиява значително клетъчната преживяемост при отсъствие на серум.....	29
ATM инхибиторите KU-60019 и KU-55933 индуцират секреция на малки и големи ИКВ, носещи автофагични маркери и такива, типични за класически екзосоми.....	30

Третиране с етопозид синергично увеличава индуцираната от KU-60019 секреция на големи и малки ИКВ, както и на извънклетъчна ДНК.....	31
Етопозидът намалява индуцираната от KU-60019 акумулация на p62; KU-60019 намалява убиквитинирането на uH2AX.....	33
Дискусия.....	34
Взаимодействие между ДНК-увреждащи агенти и автофагични инхибитори в секрецията на ИКВ.....	34
Апоптозата не допринася за наблюдаваната секреция на ИКВ.....	35
Присъствие на кавеолин в ИКВ фракциите и механизъм на неговата секреция.....	35
Взаимодействие между ДНК-увреждащи агенти и автофагични инхибитори в освобождаването на нуклеинови киселини.....	36
Влияние на ATM инхибитори върху автофагията и клетъчната преживяемост.....	37
KU-55933 и KU-60019 индуцират секреция на ИКВ.....	39
Нарушенията на автофагията, предизвикани от ATM инхибиторите допринасят за потискащото им влияние върху поправката на ДНК.....	40
Изводи.....	42
Публикации по темата на дисертацията.....	43
Участия в научни конференции.....	43
Библиография.....	44

Въведение:

През последните десетилетия извънклетъчните везикули привличат особено внимание поради множеството им новооткрити функции в здравия организъм и в болестни процеси.

В допълнение към първоначално предположеното предназначение на тяхната секреция - отстраняване на отпадни продукти, постепенно биват разкрити техните изключително комплексни роли в междуклетъчната комуникация.

Съставът и количеството на секретираните от една клетка извънклетъчни везикули отразяват нейното състояние. Те се променят в зависимост от вида на секретиращите ги клетки, степента на тяхната диференциация, както и в отговор на стимули като клетъчна активация и различни видове стрес.

Особен интерес представлява ролята на извънклетъчните везикули в автоимунни, онкологични, сърдечно-съдови, метаболитни и невродегенеративни заболявания. Поради тези причини, те биват разглеждани като диагностични маркери, за откриване и проследяване на тези патологични състояния.

Извънклетъчните везикули са ключов фактор в туморния растежи агресивност – участват в ангиогенезата, метастазирането, модулацията на туморната микросреда и имунния отговор. Това прави необходимо изследването на влиянието на терапията върху тяхната секреция, особено когато терапевтичните стратегии включват таргетиране и на други системи в клетката, които имат комплексни взаимодействия с механизмите, контролиращи биогенезата и секрецията на извънклетъчни везикули, като например автофагията.

Тъй като подобни комбинации са разглеждани в клинични проучвания, а някои от тях намират приложение и в широката практика, в настоящия труд са изследвани взаимодействията на индуктори на двойно верижни скъсвания с автофагични инхибитори в секрецията на извънклетъчни везикули.

Цел

Да се изследва взаимодействието между автофагични инхибитори и ДНК-увреждащи агенти по отношение на индуцираното от тях освобождаване на ИКВ и извънклетъчни нуклеинови киселини

Задачи

1. Анализ на цитотоксичната активност на хлорохин (CHQ) и темозоломид (TMZ) в култури от TMZ-чувствителни (U87-MG) и TMZ-резистентни (U138-MG) клетки
2. Анализ на състава и размерите на секретираните ИКВ при третиране с CHQ и TMZ
3. Потвърждаване на получените резултати при третиране с функционални аналози – Bafilomycin A1 и етопозид
4. Анализ на състава и количеството на секретираните нуклеинови киселини
5. Изследване на количеството увредена ДНК в клетки при комбинирано третиране
6. Изследване на асоциацията на секретираните нуклеинови киселини с ИКВ посредством флоу цитометричен анализ
7. Изследване на инхибирането на автофагия от инхибитори на АТМ (ATMi)
8. Изследване на влиянието на АТМi върху секрецията на ИКВ
9. Изследване на взаимодействието на АТМi с ДНК-увреждащи агенти по отношение на индуцираната от тях секреция на ИКВ

Материали и методи

Клетъчни култури

В настоящия труд са използвани глиобластомните клетъчни линии U87-MG и U138-MG, както и ендоцервикалната аденокарциномна линия HeLa Kyoto (CVCL_1922). U87-MG, U138-MG и HeLa Kyoto клетките бяха поддържани в DMEM (Gibco, Уолтъм, САЩ, 41966052). Средите за кутивиране бяха суплементирани с 10% фетален говежди серум (Gibco, 10270106), 100 единици на mL пеницилин, 100 µg/mL стрептомицин (Gibco, 15140122) и 0.25 µg/mL амфотерицин В (Gibco, 15290026). Клетките бяха отглеждани на 37 °C при 5% CO₂.

Реагенти

Bafilomycin A1 (SML1661), темозоломид (PHR1437), 1 mM разтвор от йономицин в DMSO (I3909) и Форбол-12-миристат-13-ацетат (524400) бяха закупени от Merk. Хлорохин дифосфат сол (455240250) и Brefeldin A (00-4506-51) бяха закупени от Thermo Scientific Chemicals (Уолтъм, САЩ). KU-55933 (HY-12016) и KU-60019 (HY-12061) бяха закупени от MedChemExpress. Етопозид (S1225) беше закупен от Selleckchem.

Първични антитела

От Cell Signaling Technology (САЩ):

LAMP1 (D2D11) Заешко Моноклонално Антитяло #9091;

LC3B (E5Q2K) Мише Моноклонално Антитяло #83506;

Caveolin-1 (D46G3) Заешко Моноклонално Антитяло #3267;

От Abcam (САЩ):

ds DNA [35I9] Мише Моноклонално Антитяло ab27156;

CD63 [TS63] Мише Моноклонално Антитяло ab59479;

ALIX [3A9] Мише Моноклонално Антитяло ab117600;

От Merck (Германия):

Actin (20-33) Заешко Поликлонално Антитяло A5060;

От Santa Cruz Biotechnology (САЩ):

anti- γ H2AX Мише Моноклонално Антитяло SC-517348

От Novus Biologicals (САЩ):

LC3B (NB100) Заешко Поликлонално Антитяло;

CYC1 (NBP1-86872) Заешко Поликлонално Антитяло;

p62/SQSTM1 (NBP1-49955) Заешко Поликлонално Антитяло;

Syntenin 1 (NBP1-86979) Заешко Поликлонално Антитяло;

От Abclonal (САЩ):

Phospho-ATM-S1981 (AP1030) Заешко Моноклонално Антитяло;

Phospho-Histone H2AX-S139 (AP0099) Заешко Поликлонално Антитяло.

Анализ на клетъчна преживяемост

Клетките бяха третираны в 24-ямкови плаки (2×10^5 клетки на кладенче) в 500 μ L DMEM суплементиран с 5% пречистен от екзозомы серум или без серум, в продължение на 48 часа. След третиране, клетките бяха измити с PBS, откачени с 100 μ L 1X трипсин (Thermo Fisher, 15400054), измити повторно с PBS, суплементиран с 5% серум (за неутрализиране на трипсина), и оцветени с анексин и пропидиев йодид (Thermo Fisher BMS500FI) според инструкциите на производителя. Пробите бяха анализирани с флоу-цитометър BD FACSCalibur™. Данните бяха анализирани с Cyflogic или FlowJo. Статистически анализ беше извършен с GraphPad Prism.

Изоляция на извънклетъчни везикули

Клетките бяха посяти в 6-ямкови плаки ($7,5 \times 10^5$ клетки на кладенче за глиобластомните клетъчни линии и 5×10^5 клетки на кладенче за Hela Kyoto) в DMEM суплементирани с 10% серум и бяха оставени да се прикрепят за дъното за една нощ. Адхерентните клетки бяха измити със среда за култивиране (без серум) и третираны в продължение на 48 часа в 1.5 mL DMEM с 5% свободен от екзозомы серум (Gibco, A2720803) или без съдържание на серум. Кондицирана среда (от 2 кладенчета на проба) беше обработена с диференциално центрофугиране по следния начин: 500 x g за 5

минути, 1500 x g за 15 минути и 10,000 x g за 40 минути. Утайките от центрофугирането на 10,000 x g съдържащи големи ИКВ бяха лизирани с 2x SDS Laemmli sample buffer (35 µL на проба). Супернатантите от центрофугирането на 10,000 x g бяха обработени за изолация на малки ИКВ чрез PEG преципитация.¹ Еднакви обеми от 16% Полиетилен гликол 6000 (Merck, 8074911000) в разтвор от 1M NaCl бяха смесени със супернатантите, след което пробите бяха оставени на 4 °C през нощта (поне 12 часа). След това пробите бяха центрофугирани на 3500 x g за 1 час на 4 °C. Супернатантата от последното центрофугиране беше аспирирана, след което пробите бяха центрофугирани отново (4000 x g за 2 минути) за премахване на остатъци от супернатанти съдържащи PEG. Получените утайки бяха разтворени в 35 µL 2x SDS Laemmli sample buffer и съхранявани на -20 °C.

Имуноблотинг

Протеинови проби от клетъчни лизати (WCL) и ИКВ освободени от еднакъв брой клетки бяха нагряти до 98 °C за 10 минути в 2x SDS Laemmli sample buffer суплементиран с 50 mM дитиотреитол (DTT), разделени с полиакриламид гел електрофореза (SDS-PAGE) и трансферирани на Immobilon-P мембрани, PVDF, 0.45 µm (Thermo Fisher, 88518). Съдържанието на акриламид в използваните гелове е 6%, 8% или 15%, в зависимост от изследваните маркери. След трансферирането, мембраните бяха блокирани с 5% фетален говежди серум (Sigma Aldrich, A9647) в Tris-буферен разтвор с TX-100 (TBST; pH 7.4, 10 mM Tris-HCl, 140 mM NaCl, 0.5% v:v Triton X-100) в продължение на 1 час, и инкубирани с първично анти тяло през нощта на 4 °C. След това, блотовете бяха измити 3 пъти с TBST, инкубирани с вторично HRP-конюгирано анти-мише (Thermo Fisher, 31430) или анти-заешко (Thermo Fisher, 31460) анти тяло (разредени 1:20,000) на стайна температура за 1 час. След трикратно измиване с TBST, блотовете бяха инкубирани със SuperSignal™ West Pico PLUS (Thermo Fisher, 34580) или SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Fisher, 34095), в зависимост от силата на сигнала. Снимките на блотовете бяха направени с C-DiGit Blot Scanner (LI-COR Biosciences—GmbH), а денситометрията беше извършена с Image Studio™. Статистически анализ беше извършен с GraphPad Prism.

За CD63 дот блотовете, по 1 µL нередуцирани ИКВ проби в 2x SDS Laemmli sample buffer беше нанесен в дубликати върху Protran® Supported нитроцелулозни мембрани (GE10600020), които бяха обработвани като тези от SDS-PAGE.

DLS (Dynamic Light Scattering) анализ

След диференциално центрофугиране, ИКВ проби изолирани от кондицирана среда бяха ресуспендирани в 1x PBS. Измервания на размера на частиците бяха извършени чрез динамично разсейване на светлина (DLS) със Zetasizer Nano ZS analyzer (Malvern Instruments, Малверн, Великобритания). Анализът беше извършен с 10 x 10 кювета за еднократна употреба (DTS0012). На всяка проба бяха направени по три повторни измервания. Данните за всеки от размерите бяха представени като процент от всички частици.

Флуоресцентна микроскопия

13 милиметрови кръгли покривни стъкла (VWR, MARI0117530) бяха стерилизирани с етанол, оставени да изсъхнат и поставени в 24 ямкови плаки. 2×10^5 глиобластомни или 5×10^4 HeLa клетки бяха посяти върху всяко стъкло. След посаждане, клетките бяха оставени да се прикрепят за една нощ. Третирането беше извършено в продължение на 48 часа в DMEM суплементиран с 5% свободен от екзозоми серум или без серум. Клетките бяха фиксирани и пермеабелизирани със студен метанол за 10 минути, след което – блокирани с PBS съдържащ 5% фетален говежди серум за 30 минути. Пробите бяха инкубирани с първични антитела в продължение на 1 час, измити с PBS, след което инкубирани с вторични антитела в продължение на 45 минути.

Бяха използвани следните вторични антитела: анти-заешко IgG Alexa Fluor 555 (Cell Signaling, 4413S), анти-мише IgG Alexa Fluor 488 (Cell Signaling, 4408S) и анти-мише AlexaFluor 647 (Invitrogen, A-21237) в разредки от 1:1000.

След измиване с PBS и оцветяване с 1 $\mu\text{g/mL}$ DAPI (Thermo Fisher, 62248), покривните стъкла бяха монтирани с ProLong™ Diamond Antifade Mountant (Thermo Fisher, P36965).

Снимките бяха направени с Leica Stellaris 8 конфокална система със 100x обектив с маслена имерсия. Снимките бяха обработени и анализирани с ImageJ.

Анализ на извънклетъчни нуклеинови киселини

Кондицирани супернатанти бяха предварително пречистени чрез последователни центрофугирания на 500 x g за 5 минути и на 1500 x g за 15 минути. Към

супернатантите бяха добавени еднакви на тях обеми 16% PEG, 1M NaCl и сместа беше инкубирана през нощта на 4 °C. След това пробите бяха центрофугирани на 3500 x g на 4 °C за 1 час за утаяване на ИКВ и извънклетъчната ДНК. Пелетите бяха ресуспендирани в 300 µL PBS и бяха инкубирани с 0.2% Triton X-100 и 10 µg/mL протеиназа К (Invitrogen, 10665795) в продължение на 45 мин на 37 °C за смилане и дисоцииране на протеини от нуклеиновите киселини. Равен на пробата обем смес от Фенол/Хлороформ/Изоамилов алкохол (25:24:1), наситен с 100 mM Tris-EDTA до pH 8 (Thermo Scientific Chemicals, 327111000) беше добавен към пробата. След последващо вортексиране и центрофугиране на 10,000 x g в продължение на 5 минути, супернатантата/водната фаза беше трансферирана до друга епруветка, смесена със същия като пробата обем хлороформ, вортексирана и центрофугирана отново на 10,000 x g в продължение на 5 минути. Последната стъпка беше повторена още веднъж. След това горната фаза беше пренесена до друга епруветка и към нея бяха добавени натриев ацетат (до получаване на 0.3 M концентрация) и 2.5 обема 96% етанол. Получените смеси бяха изстудени в продължение на 1 час на -70 °C, след което центрофугирани на 17,000 x g в продължение на 30 минути. Утайките от центрофугирането бяха разтворени в ТЕ буфер. Получените проби бяха анализирани за абсорбция на 260 nm с NanoDrop™ 2000 и бяха нанесени за електрофореза в 1% агарозен гел оцветен с етидиев бромид. За анализ на чувствителността към ДНАза и РНАза, 5 µL от пробите бяха суплементирани с буфер за ДНАза I (10 mM Tris-HCl (pH 7.5 на 25 °C), 2.5 mM MgCl₂, 0.1 mM CaCl₂) и 5 KU ДНАза I (Sigma Aldrich, D4263) или 10 µg/mL РНАза А (Sigma Aldrich, R-5125). Крайните обеми от нетретираните с нуклеази контроли и пробите третираните с нуклеази бяха приведени до 10 µL и пробите бяха инкубирани на 37 °C в продължение на 30 минути. Протеиназа К (10 µg/mL) беше добавена към всяка проба за да разгради и дисоциира РНАза А от ДНК молекулите, както и ДНАза I от РНК молекулите и пробите бяха инкубирани на 37 °C в продължение на 15 минути. Контролите и пробите третираните с нуклеази бяха подложени на електрофореза в 1% агарозен гел оцветен с 0.5 µg/mL етидиев бромид и изследвани с УВ-илюминатор.

За засичане на извънклетъчните нуклеинови киселини, асоциирани с изолираните с центрофугиране на 10,000 x g големи ИКВ и частици, утайките от това центрофугиране бяха ресуспендирани в 1x PBS и оцветени с 100 ng/mL пропидиев йодид (eBioscience™, 00-6990-50), след което бяха анализирани с флоу-цитометър FACS Calibur (Becton Dickinson, САЩ) с ниска скорост на потока и фиксирано време – 50

секунди. Проби от некондицирана среда бяха обработени паралелно с пробите от ИКВ и частици, като контрол за наличието на замърсители в средата за клетъчно култивиране или в буфера.

Алкален кометен анализ

Анализът е извършен в съответствие с публикуван протокол.^{2 3} Предметните стъкла бяха краткотрайно потопени в 1% (w/v) агароза с нормална точка на топене, задните им страни бяха избърсани, след което те бяха оставени на стайна температура за една нощ. Клетъчните суспензии бяха преброени с автоматичен брояч (Countess®, Invitrogen) и центрофугирани на 300 x g за 5 минути на 4 °C, измити с ледено студен PBS и центрофугирани отново. 25 µL от клетъчната суспензия в PBS (приблизително 1×10^6 клетки на mL) бяха смесени със 100 µL 0.75% LMP агароза с ниска точка на топене. Две капки (60 µL) от сместа бяха трансферирани на предварително обработени предметни стъкла. Гелове бяха покрити с покривни стъкла и оставени за 5 минути на 4 °C на тъмно. След това покривните стъкла бяха премахнати и предметните стъкла бяха поставени в стандартен разтвор за лизиране (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris base, pH 10–10.5, с добавени 1 mL Triton X-100 и 10 mL DMSO преди употреба) за поне 1 час в Coplin буркан на 4 °C на тъмно. След това предметните стъкла бяха пренесени директно до резервоара за електрофореза, съдържащ студена (4 °C) 0.3 M NaOH и 1 mM Na₂EDTA, pH > 13, и инкубирани преди електрофореза за 20 минути. Електрофорезата беше извършена на ~1 V/cm за 20 мин, pH > 13 на 4 °C. Гелове бяха неутрализиране чрез измиване в студен неутрализиращ разтвор (400 mM Tris–HCl, pH 7.5) 3 пъти за по 5 минути. Предметните стъкла бяха измити за 10 минути в студена (4 °C) dH₂O. Гелове бяха оставени да изсъхнат за една нощ. Пробите бяха оцветени с 1X SYBR™ Gold Nucleic Acid Gel Stain (Invitrogen, S11494) за 10 минути на стайна температура и визуализирани с Axiovert 200 флуоресцентен микроскоп (Zeiss, Германия). Снимките бяха анализирани с CaspLab—Comet Assay.⁴

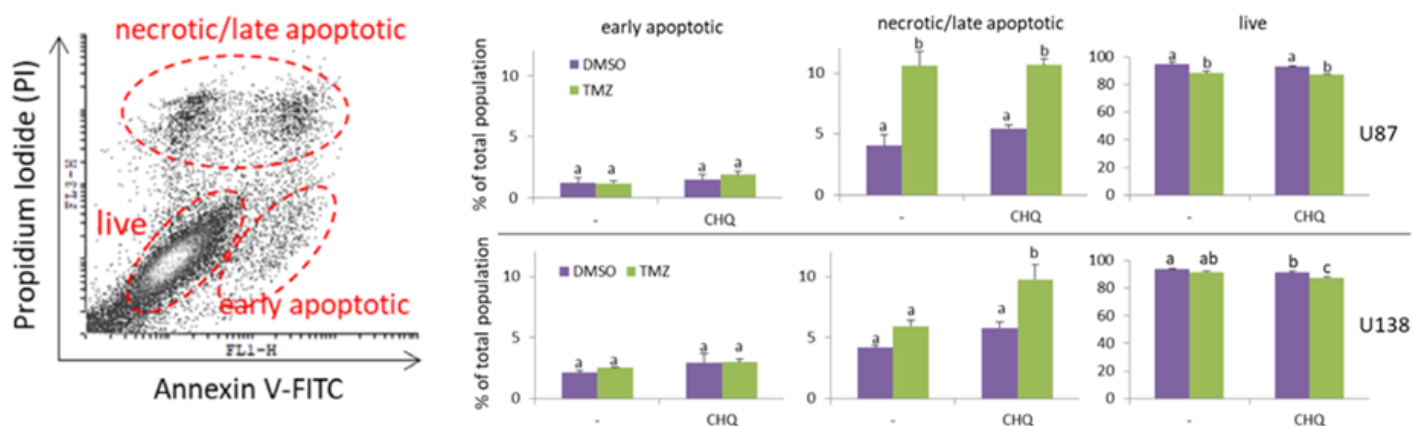
Резултати

CHQ значително повишава цитотоксичния ефект на TMZ срещу TMZ-резистентни клетки, но не и срещу TMZ-чувствителни клетки

Индукцията на апоптоза и съпътстващото отделяне на апоптотични тела с размери припокриващи се с тези на миковезули и екзосоми може значително да допринесе към съвкупността от извънклетъчни везикули (ИКВ). В тази връзка, важен аспект от анализиранията на активната секреция на ИКВ е да се изследват нивата на апоптоза в специфичните експериментални условия.

В това проучване бяха използвани две глиобластомни клетъчни линии за да се изследва потенциалното взаимодействие между темозоломид (TMZ) и хлорохин (CHQ) при секрецията на ИКВ. U87-MG клетките са познати като TMZ-чувствителни, тъй като не експресират Об-Метилгуанин-ДНК Метилтрансфераза (MGMT). Същевременно U138-MG клетките експресират този ензим и са демонстрирано по-резистентни към TMZ в сравнение с клетки, които не експресират MGMT.⁵ Обикновено за *in vitro* експерименти с ИКВ се използва среда без серум, или с понижено съдържание (2-5%) на серум, предварително пречистен от ИКВ, за да се намали количеството албумин и други протеини, асоцииращи се с липиди, които биха могли да се асоциират с ИКВ. В настоящото проучване сравнихме ефектът на 10 μ M CHQ върху цитотоксичността на 400 μ M TMZ към U87-MG и U138-MG клетъчни култури след 48 часова инкубация в среда с 5% серум, пречистен от ИКВ. Тези концентрации бяха избрани въз основа на предходни доклади: IC₅₀ стойностите на TMZ за U87-MG клетки обикновено са ~100–300 μ M (при третиране в продължителност на 24-72 часа), същевременно U138-MG са значително по-резистентни, с IC₅₀ стойности приближаващи 1mM. CHQ е цитотоксичен за глиобластомни клетки в концентрации над 10 μ M, но е широко използван в концентрация от 10 μ M в проучвания, изследващи ролята му като автофагичен инхибитор или сенсibiliзатор към TMZ. Потвърждавайки предходни доклади⁵, оцветяването с PI/Annexin V-FITC демонстрира, че U87-MG клетките са по-чувствителни към TMZ в сравнение с U138-MG – съответно 10.6% и 5.92% късно апоптотични/некротични клетки (**Фигура 1**). Добавянето на CHQ значително повиши процентът от TMZ-индуцираните PI-позитивни късно апоптотични/некротични клетки в култури от U138 (9.76%), но не и в култури от U87 клетки (10.63%). Съгласно с това,

комбинирано третиране с TMZ + CHQ значително понижи процента живи U138-MG клетки (87.25%) в сравнение с третиране единствено с TMZ (91.56%), което не се наблюдава при култури от U87-MG клетки (87.42% и 88.23%, съответно).

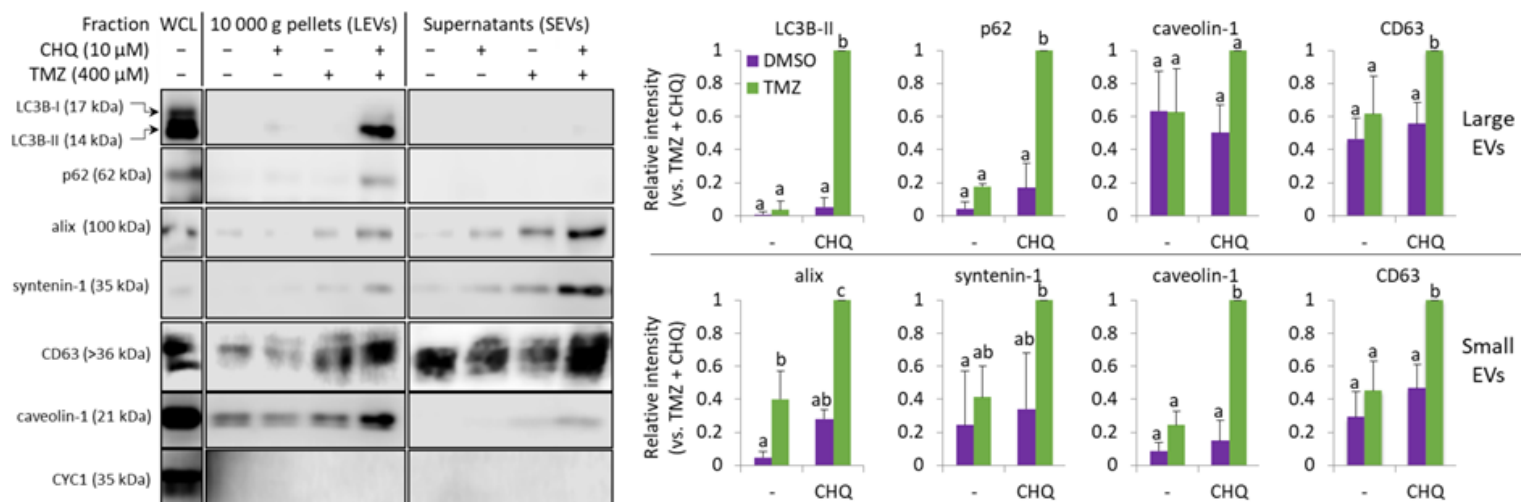


Фигура 1. CHQ значително повишава цитотоксичния ефект на TMZ срещу TMZ-резистентни клетки (U138-MG), но не и срещу TMZ-чувствителни клетки (U87-MG).

Клетки бяха третирани в среда с 5% пречистен от ИКВ серум с контрола (0.2% DMSO), 10 μ M CHQ, 400 μ M TMZ, или комбинация от TMZ+CHQ, в продължение на 48 часа. Клетките бяха оцветени с Annexin V-FITC и Пропидиев Йодид (PI) и бяха анализирани с флоу-цитометрия. Ляво – репрезентативен дот плот, районирането на популациите от живи, ранно апоптотични и късно апоптотични/некротични клетки. Дясно – Хистограми, показващи средния процент U87-MG и U138-MG клетки в съответните райони. N=3; ленти за грешка – стандартно отклонение. Данните бяха анализирани с двуфакторен ANOVA и Tukey's post hoc test. Разликите в средни стойности на третирания обозначени с една и съща буква не са статистически значими, $p < 0.05$

TMZ и CHQ синергично индуцират секреция на ИКВ, съдържащи автофагични маркери и caveolin-1 в култури от U87-MG клетки

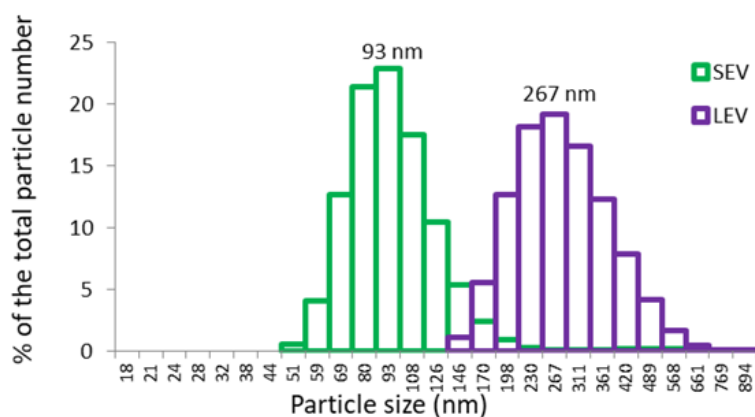
Протеинови проби от големи и малки ИКВ от контролни клетки третирани с DMSO, и такива третирани с 400 μ M TMZ, 10 μ M CHQ или комбинация от TMZ и CHQ бяха сравнени чрез SDS-PAGE/имуноблотинг (**Фигура 2**). Автофагичните маркери (LC3B-II и p62) и екзозомните маркери (alix и syntenin-1) бяха значителни повишени от комбинацията TMZ+CHQ съответно в големи и малки ИКВ. Друг широко използван ИКВ маркер – CD63 беше засечен във всички проби, включително и тези третирани с DMSO, но той също демонстрира значително повишение в големи и малки ИКВ при третиране с TMZ+CHQ. Тъй като CD63 е силно гликозилиран и обикновено формира размазка на Western блотове, за подобряване на точността, той беше околичествен с dot блотове. Подобно на CD63, caveolin-1 беше засечен във всички проби от големи ИКВ, включително и контролните. За разлика от CD63 обаче, caveolin-1 не беше открит контролни проби от малки везикули, и подобно на екзозомните маркери, беше синергично увеличен от комбинацията TMZ+CHQ в същите. Митохондриалният маркер цитохром C1 (CYC-1), чието отсъствие е очаквано в качествено пречистени проби от ИКВ, не беше засечен в нито една от пробите, което е индикация за адекватната чистота на ИКВ пробите от настоящото проучване. Хидродинамичното размерно разпределение на ИКВ беше определено чрез анализ на динамичното разсейване на светлината (DLS) (**Фигура 3**). Само проби от клетки, третирани с TMZ и CHQ дадоха измерими резултати, вероятно поради прекалено малкия брой на ИКВ в останалите проби. Размерът на ИКВ от клетки третирани с TMZ+CHQ беше от порядъка на 50 до 150 nm за малки и 150-500 nm за големи ИКВ, което е типично за съответно екзозоми и микровезикули.



Фигура 2. TMZ и CHQ синергично индуцират секреция на ИКВ, съдържащи автофагични маркери и caveolin-1 в култури от U87-MG.

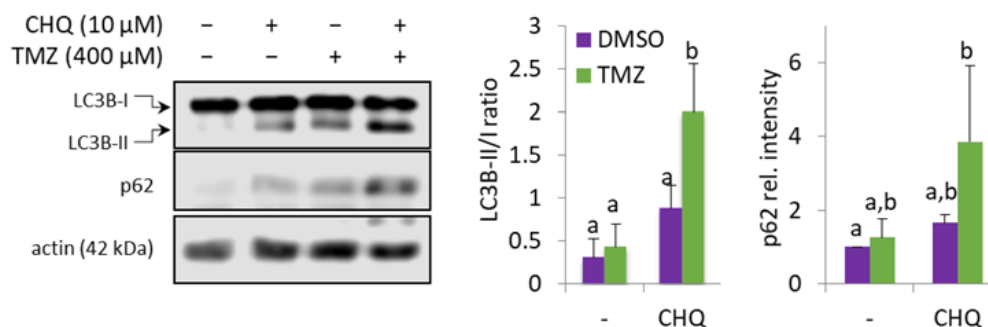
Ляво – проби от големи ИКВ (LEVs) и малки ИКВ (SEVs) от клетки, третирани както е посочено в продължение на 48 часа, бяха анализирани чрез Western блот с помощта на съответните антители. ИКВ изолирани от еднакви обеми кондицирана среда сравнени паралелно с 10 μ g протеин от клетъчни лизати (WCL).

Дясно – денситометрия. Тъй като някои от маркерите бяха неоткриваеми в контролни проби, стойностите на денситометрията са представени като относителни към най-високия интензитет – пробите от TMZ+CHQ. N=3; ленти за грешка – стандартно отклонение. Данните бяха анализирани с двуфакторен ANOVA и Tukey's post hoc test. Разликите в средни стойности на третирания обозначени с една и съща буква не са статистически значими, $p < 0.05$



Фигура 3. DLS анализ на ИКВ от U87-MG клетки, третирани с TMZ+CHQ

В клетъчни лизати (WCL), TMZ не предизвика значителна акумулация на p62 или липидирания, мембранно-асоцииран LC3B-II, но тези автофагични маркери бяха значително повишени в проби от третиран с комбинацията TMZ+CHQ в сравнение с контролни проби или индивидуални третираня (Фигура 4).



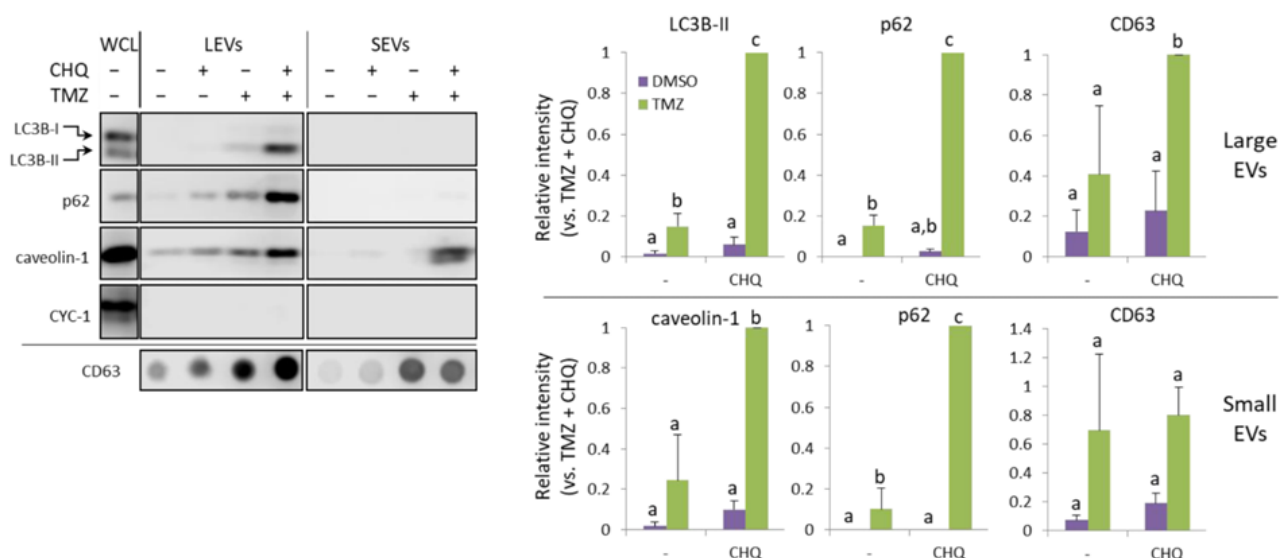
Фигура 4. - Western блот анализ на LC3B и p62 в клетъчни лизати от U87-MG клетки.

Стойностите на LC3B-II са представени като относителни към LC3B-I. p62 е нормализиран с актин и представен като относителен към нивата в контролни клетки. $N=3$; ленти за грешка – стандартно отклонение. Данните бяха анализирани с двуфакторен ANOVA и Tukey's post hoc test. Разликите в средни стойности на третираня обозначени с една и съща буква не са статистически значими, $p < 0.05$

TMZ и CHQ синергично индуцират секреция на ИКВ, съдържащи автофагични маркери и caveolin-1 в култури от U138-MG

U138-MG клетки, третиран с TMZ и CHQ реагираха подобно на U87-MG клетки – със синергично повишаване на нивата на LC3B-II и p62 във фракцията от големи ИКВ, както и кавеолин в тази на малки ИКВ. (Фигура 5). Нивата на p62 в малки ИКВ бяха много по ниски от тези в големи ИКВ, но все пак синергично повишени. Въпреки гореспоменатия значителен сенсibiliзиращ ефект на CHQ по отношение на цитотоксичността на TMZ към U138-MG клетки, CUC-1 не беше засечен в нито една от пробите. Това е сведение, че наблюдаваният ефект се дължи по-скоро на активни

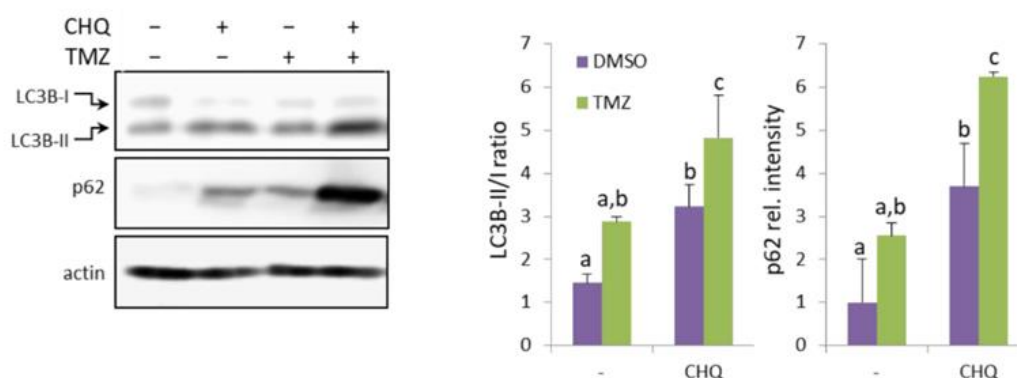
секреторни механизми, отколкото на пасивно освобождаване на материал от умиращи клетки.



Фигура 5. TMZ и CHQ синергично индуцират секреция на ИКВ, съдържащи автофагични маркери и caveolin-1 в култури от U138-MG

Показани са Western и дот блотове (ляво), както и денситометрия (дясно) на ИКВ от U138-MG клетки, третираните както е посочено в продължение на 48 часа. Пробите са обработени подобно на тези от Фигура 9. N=3; ленти за грешка – стандартно отклонение. Данните бяха анализирани с двуфакторен ANOVA и Tukey's post hoc test. Разликите в средни стойности на третирания обозначени с една и съща буква не са статистически значими, $p < 0.05$

Подобно на U87-MG, LC3B-II и p62 бяха значително повишени в клетъчни лизати от U138-MG клетки при третиране с TMZ+CHQ в сравнение с контроли или индивидуални третирания (Фигура 6).

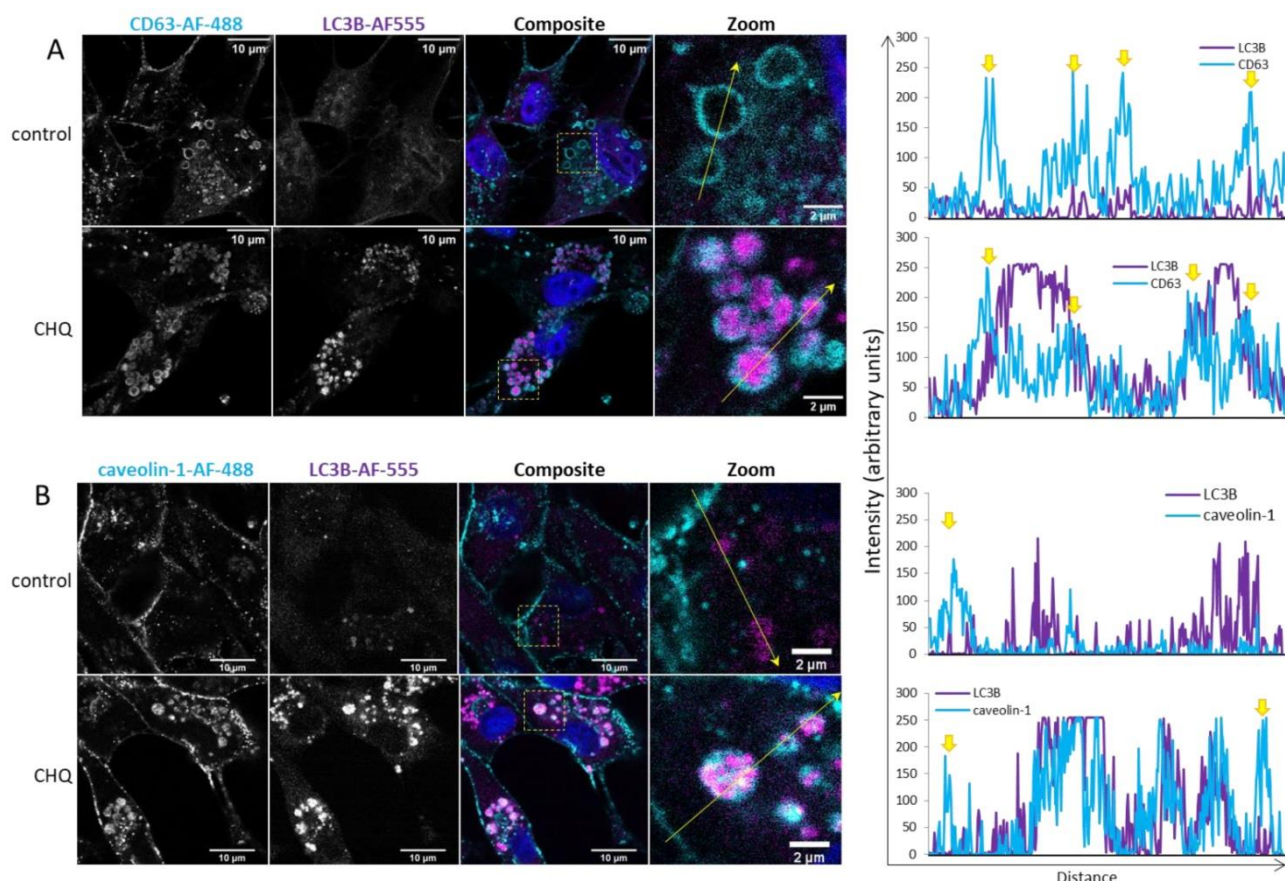


Фигура 6. Western блот анализ на LC3B и p62 в клетъчни лизати от U138-MG клетки.

Клетките са третирани както е означено в продължителност на 48 часа. $N=3$; ленти за грешка – стандартно отклонение. Данните бяха анализирани с двуфакторен ANOVA и Tukey's post hoc test. Разликите в средни стойности на третирания обозначени с една и съща буква не са статистически значими, $p < 0.05$

CHQ предизвиква натрупване на LC3B в лумена на CD63 позитивни амфизоми/автолизозоми; LC3B и caveolin-1 колокализират в индуцираните от CHQ агрегати от LC3B

В клетките, caveolin-1 е асоцииран предимно с кавеоли – мембранны инвагинации, чиито размери са подобни на тези на екзозомите (50-100 nm). Въпреки че познатият начин за секреция на този протеин е посредством големи онкозоми с произход от плазмената мембрана, които имат прогностична стойност за метастатичен рак⁶, директно освобождаване на кавеоли от плазмената мембрана не е демонстрирано. Това повдига въпрос за произхода на caveolin-1 в малки ИКВ, индуцирани от третиране с TMZ+CHQ. Тук ние демонстрираме, че третиране с CHQ води до ефективно акумулиране на големи агрегати от LC3B в CD63-позитивни вътреклетъчни вакуоли, което показва, че това са автолизозоми и/или амфизоми (**Фигура 7 А**). Лизозомният инхибитор също предизвиква и колокализация между LC3B и caveolin-1 в тези относително големи вътреклетъчни везикули (**Фигура 7 В**), които вероятно представляват източника на индуцираните от TMZ+CHQ ИКВ, включително натоварените с caveolin-1 малки ИКВ.



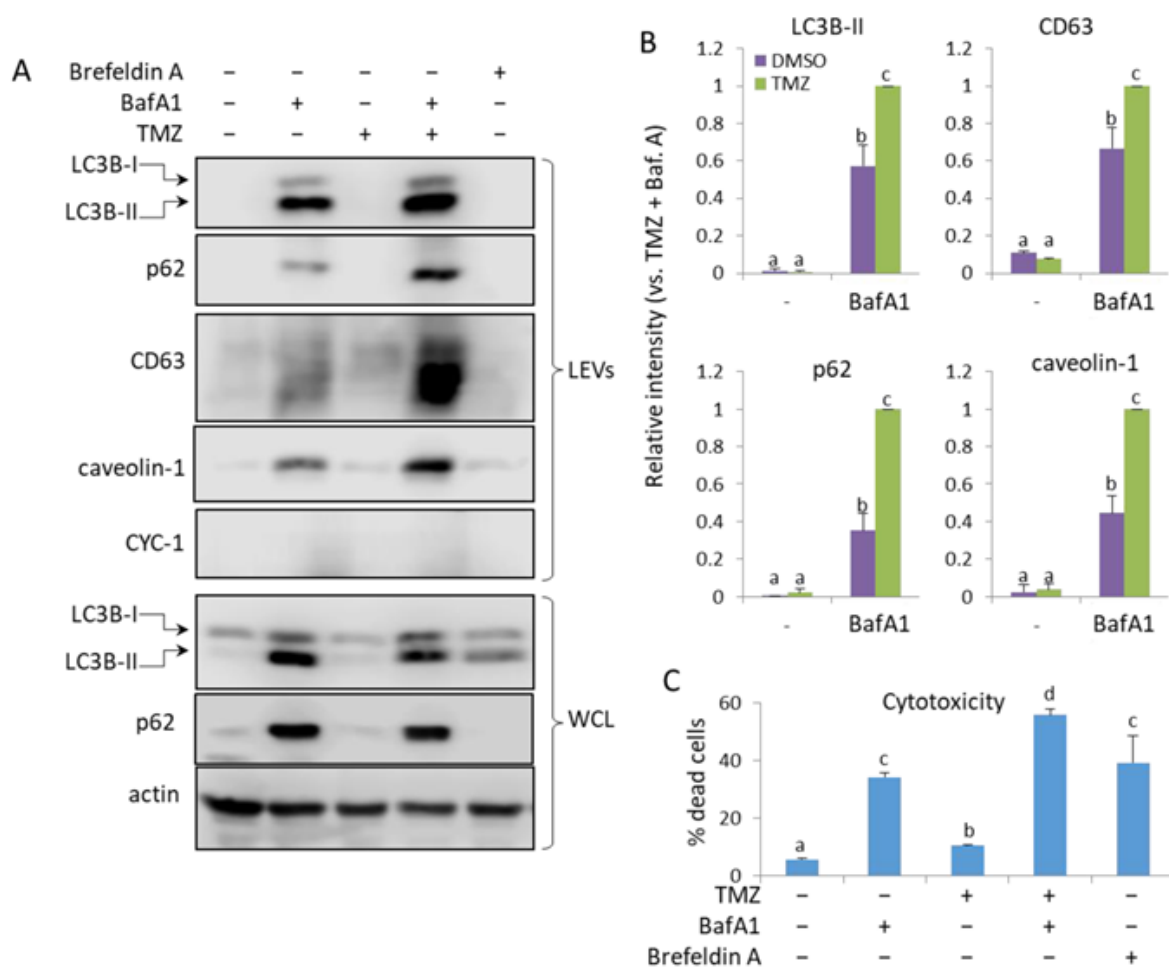
Фигура 7. CHQ предизвиква натрупване на LC3B в лумена на CD63 позитивни амфизоми/автолизозоми; LC3B и caveolin-1 колокализират в индуцираните от CHQ агрегати от LC3B.

(A) – Контролни U87-MG и такива, третирани с 10 μ M CHQ бяха фиксирани след 48 часово третиране. CD63 беше оцветен с мише анти-CD63 антитяло и вторично Alexa Fluor 488 антитяло (циан); LC3B беше оцветен със заешко анти-LC3B антитяло и вторично Alexa Fluor 555 антитяло (магента); ядрата бяха оцветени с DAPI (синьо в композитните изображения). Снимките бяха направени с Leica Stellaris 8 конфокална система. Позициите на увеличените изображения са посочени с прекъснатите правоъгълници. Стрелките върху изображенията обозначават позицията и посоката на интензитетните профили, представени вдясно от изображенията. Жълтите стрелки върху интензитетните профили на CD63 обозначават лимитиращите мембрани на CD63-позитивните везикули.

(B) – U87-MG клетки са третирани и анализирани подобно на панел (A) с помощта на мише анти-LC3B и заешко анти-caveolin-1 антитела. Жълтите стрелки върху интензитетния профил на caveolin-1 обозначават плазмената мембрана.

TMZ повишава индуцираната от Bafilomycin A1 секреция на ИКВ

За да установим дали TMZ проявява синергичен ефект и с други автофагични инхибитори по отношение на повишена секреция на ИКВ, експеримент подобен на този от **Фигура 9** беше направен с Bafilomycin A1 (BafA1). Подобно на CHQ, BafA1 е широко използван за блокиране на лизозомната функция и съответно - деградационната автофагия. Третиране на U87-MG клетки с 50nM BafA1 индуцира секреция на големи ИКВ, съдържащи LC3B-II, p62, CD63 и caveolin-1, която беше значително увеличена от добавянето на TMZ (**Фигура 8 А, В**). BafA1 прояви значителен цитотоксичен ефект върху глиомните клетки, като при добавянето на TMZ, PI-позитивните клетки надвишават 50%. Поради това, в този експеримент беше включено и третиране с Brefeldin A (BFA). BFA е инхибитор на втреклетъчния везикуларен транспорт и секрецията на ИКВ, модулатор на автофагията и индуктор на апоптоза.^{7 8 9 10} Въпреки че BFA проявява цитотоксичност, съпоставима с тази на BafA1 (**Фигура 8 С**), BFA не предизвика доловимо повишение на секрецията на ИКВ от U87-MG клетки (**Фигура 8 А**).



Фигура 8. TMZ повишава индуцираната от Bafilomycin A1 секреция на големи ИКВ, съдържащи LC3B-II, p62, CD63 и caveolin-1.

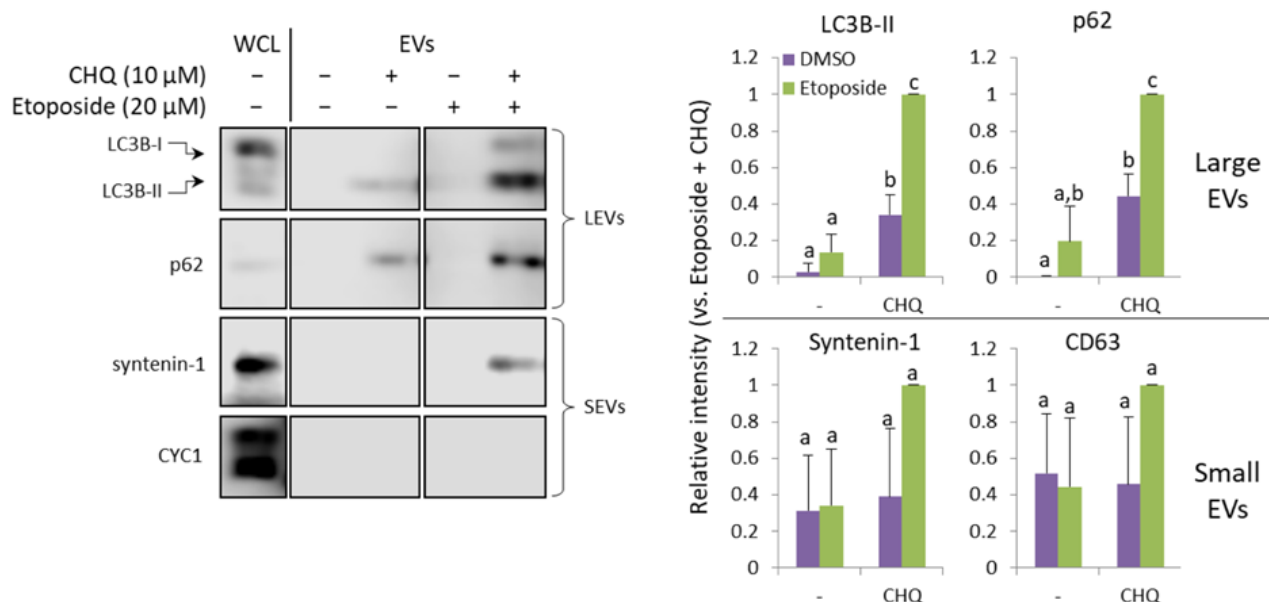
(A) – Western блот изображения на големи ИКВ и клетъчни лизати от U87-MG клетки, третиран с 50 nM BafA1, 400 μ M TMZ и 3 μ g/mL Brefeldin A, както е посочено.

(B) – Денситометрия на относителните стойности на съответните маркери в големи ИКВ.

(C) – Цитотоксичността на третиранията е анализирана с оцветяване с PI и флоу-цитометрия. Графиката показва процентът мъртви (PI-позитивни) клетки. N=3; ленти за грешка – стандартно отклонение. Разликите в средни стойности на третирания обозначени с една и съща буква не са статистически значими, $p < 0.05$

CHQ и етопозид синергично индуцират секреция на автофагични маркери във фракцията на големи ИКВ

Подобно на предходния експеримент, за да установим дали CHQ проявява синергичен ефект и с други генотоксични агенти по отношение на повишена секреция на ИКВ, беше направен експеримент с етопозид – химиотерапевтичен агент, който индуцира увреждане на ДНК чрез инхибиране на топоизомеразата II.¹¹ Използвахме етопозид в концентрация 20 μM след внимателно титруване, с цел постигане на нива на отговор към увреждане на ДНК (чрез измерване на γH2AX), съпоставими с тези, индуцирани от 400 μM TMZ. Резултатите представени във **Фигура 9** демонстрират, че подобно на TMZ, етопозидът значително повишава индуцираната от CHQ секреция на автофагични маркери от U87-MG клетки.



Фигура 9. CHQ и етопозид синергично индуцират секреция на автофагични маркери във фракцията на големи ИКВ

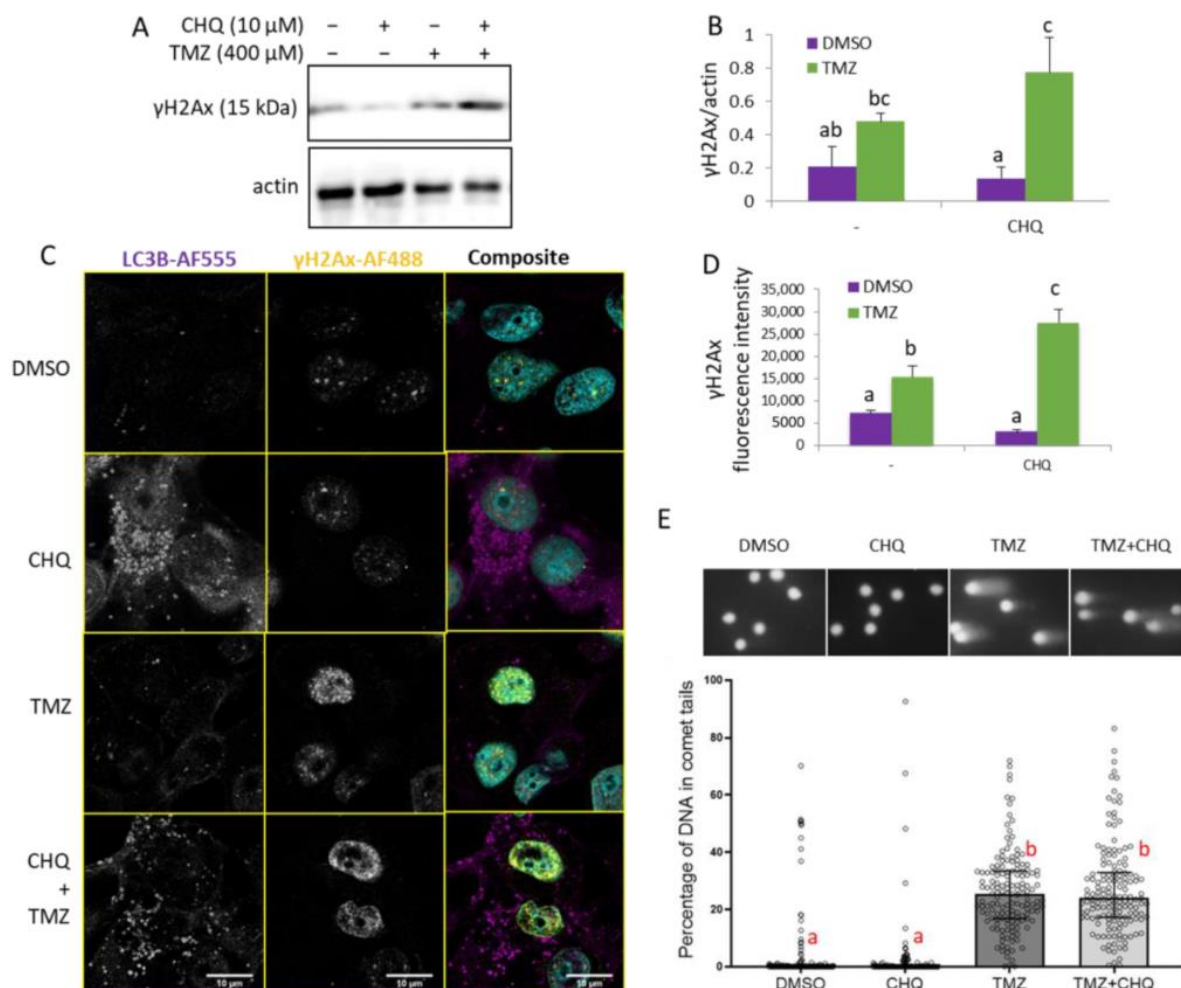
Western блот анализ и денситометрия на проби от ИКВ от U87-MG клетки третирани както е посочено в продължение на 48 часа. $N=3$; ленти за грешка – стандартно отклонение. Разликите в средни стойности на третирания обозначени с една и съща буква не са статистически значими, $p < 0.05$

СНQ усилва предизвикания от TMZ отговор към увредена ДНК, но не увеличава съдържанието на увредена ДНК в U87-MG клетки

Познато е, че СНQ индуцира увреждане на ДНК в някои клетъчни линии.¹²

В настоящето проучване, не наблюдавахме значително повишение на нивата на уН2АХ при третиране на U87-MG клетки с СНQ - вероятно поради ниската концентрация, която използвахме. СНQ доведе до статистически незначимо, но консистентно понижение на нивата на уН2АХ, което е в контраст със значителното му повишение при третиране с TMZ+СНQ, наблюдавано както с Western блот (**Фигура 10 А, В**), така и с имуноцитохимия (**Фигура 10 С, D**).

Директният ефект на СНQ и TMZ върху интегритетът на ДНК беше анализиран чрез алкален кометен анализ, който засича както едноверижни, така и двуверижни скъсвания на ДНК (**Фигура 10. Е**). Очаквано, резултатите показват, че третирането с TMZ индуцира увреждане на ДНК, като се наблюдава значително увеличение на количеството ДНК в опашките на кометите. Същевременно, третирането с СНQ не предизвика увеличение на количеството увредена ДНК - нито самостоятелно, нито в комбинация с TMZ.



Фигура 10. CHQ усилва предизвикания от TMZ отговор към увредена ДНК, но не увеличава съдържанието на увредена ДНК в U87-MG клетки

(A) – Акумулирането на γ H2AX беше анализирано чрез Western блот в U87-MG клетки, третирани в продължение на 48 часа както е посочено.

(B) – Денситометрия на сигнала на γ H2AX, нормализиран спрямо актин. N=3; ленти за грешка – стандартно отклонение.

(C) – Изображения от конфокална микроскопия на U87-MG клетки, третирани както е посочено и оцветени с антитела срещу LC3B и γ H2AX (заешко и мише, съответно). Пробите бяха оцветени с вторични анти-заешко Alexa Fluor-555 (виолетово) и анти-мише Alexa Fluor 488 (жълто) антитела. ДНК беше оцветена с DAPI (циан).

(D) – Околичествяване на флуоресцентния интензитет на γ H2AX в клетъчни ядра. Хистограмите показват средните стойности на флуоресцентния интензитет на γ H2AX на ядро. N=10; ленти за грешка – стандартно отклонение.

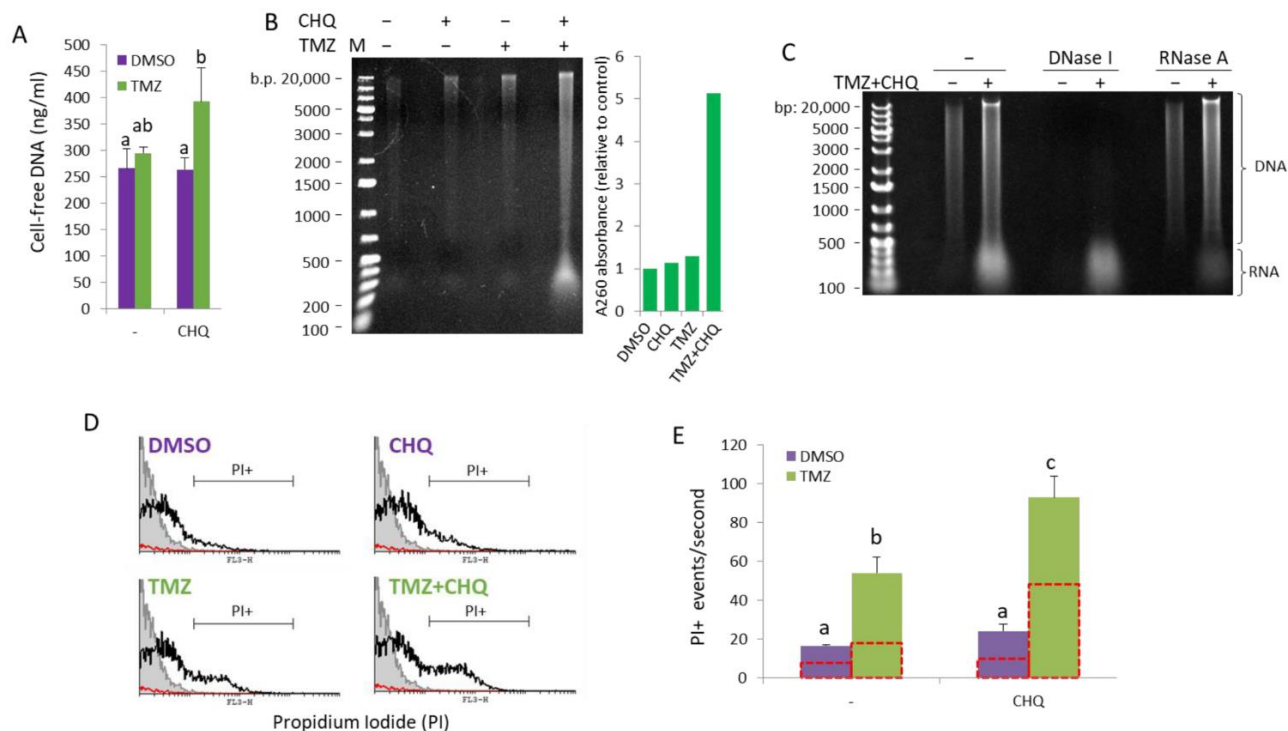
(E) – U87-MG клетки бяха анализирани чрез кометен анализ и процентът ДНК в опашките на кометите беше изчислен чрез софтуер CaspLab. Графиката под репрезентативните изображения показва средните стойности; лентите за грешка представят кварталния обхват, n = 150.

CHQ и TMZ синергично индуцират секреция на извънклетъчни нуклеинови киселини в култури от U87-MG клетки

Концентрацията на извънклетъчна ДНК беше измерена директно от кондицирани супернатанти от клетки, третирани във FluoroBrite™ среда чрез високо чувствителен за двойноверижна ДНК кит - Qubit™ 1X. В сравнение с контролни клетки или индивидуални третириания, значително увеличение на извънклетъчна ДНК беше наблюдавано в проби, третирани с TMZ+CHQ (**Фигура 11 А**). За да установим размерното разпределение на нуклеиновите киселини (НК) в кондицираната среда, извънклетъчни НК бяха изолирани от супернатанти (предварително пречистени чрез центрофугиране на 500x g и 1500x g) чрез екстракция с фенол/хлороформ/изоамилов алкохол, със и без третиране с ДНАза или РНАза. НК изолирани от еднакви обеми кондицирани супернатанти от клетки, третирани в продължение на 48 часа, бяха анализирани чрез електрофореза на агарозен гел, оцветен с етидиев бромид (**Фигура 11 В**). Пробите съдържаха молекули с размери от 200 до 20 000 базови двойки. Третиране на НК пробите с нуклеази преди анализирането им на агарозен гел показва, че размазката с размер над 500 бази се състои предимно от ДНК, а мнозинството от молекули с размер под 500 бази бяха чувствителни към РНАза (**Фигура 11 С**). A260 абсорбцията на пробите, анализирани на агарозните гелове, беше значително увеличена в пробата от третирането с TMZ+CHQ в сравнение с контроли или индивидуални третириания. Поради различните коефициенти на поглъщане на едноверижна ДНК, двувверижна ДНК и РНК, точно и абсолютно околичествяване на проби от смесени НК не е възможно чрез спектрометрия.

В съответствие с литературни данни, активната секреция на извънклетъчна ДНК може да е зависима от ИКВ, или зависима от амфизоми, но не и екзозоми.¹³ За да изследваме асоциирането на индуцираната от TMZ+CHQ извънклетъчна ДНК с ИКВ и детергент-резистентни частици, анализирахме оцветени с PI проби от ИКВ чрез флоу-цитометрия. Тъй като флоу-цитометрията на малки ИКВ като екзозоми е затруднена поради фонов шум и swarming - ефекти, в този анализ включихме само проби с големи ИКВ. PI (100 ng/mL) беше добавен към пробите с големи ИКВ, ресуспендирани в PBS, и PI-позитивните (PI+) ИКВ и частици бяха околичествени използвайки ниска проточна скорост и фиксирано време (50 секунди). Резултатите показват, че TMZ сам по себе си индуцира значително повишение на броя на PI+ ИКВ и частици (**Фигура 11 D**), което е синергично увеличено от добавянето на CHQ (**Фигура 11 E**). Третиране на пробите с

1% Triton X100 намали броя на PI+ събитията във всички проби с около 50%, което показва, че пробите съдържат както ИКВ, така и детергент-резистентни частици, асоциирани с ДНК.



Фигура 11. CHQ и TMZ синергично индуцират секреция на извънклетъчни нуклеинови киселини в култури от U87-MG клетки

(A) – Извънклетъчна ДНК беше директно измерена в кондиционирани супернатанти от клетки, третираны във FluoroBrite™ DMEM чрез високочувствителен за двойноверижна ДНК кит Qubit™ IX.

(B) – Извънклетъчни НК бяха изолирани от кондиционирани супернатанти чрез фенол/хлороформ/изоамилов алкохол и бяха визуализирани на агарозен гел, оцветен с етидиев бромид. Хистограмата вдясно от снимката на гела показва стойностите на A260 абсорбция на общото количество НК, отнесено към контролата.

(C) – Извънклетъчни НК от контролни клетки и такива, третираны с TMZ+CHQ бяха третираны с ДНАза I и РНАза А, както е обозначено, преди гел електрофорезата, което демонстрира присъствието на ДНК и РНК молекули в пробите от третирането с TMZ+CHQ.

(D) – Детекция на извънклетъчни НК асоциирани с големи ИКВ и частици чрез флуориметрия. ИКВ и частици, изолирани чрез центрофугиране на 10 000x g бяха оцветени с PI и бяха анализирани с FACS Calibur, на ниска проточна скорост и

фиксирано време. Проби от некондицирана среда бяха обработени паралелно с тези от кондицираната среда, като контрола за присъствие на замърсяващи частици в средата и буфера. Представителните хистограми показват неоцветените контроли (запълнен, сив контур), оцветени ИКВ и частици (незапълнен, черен контур), и PBS контролите (червен контур).

(E) – Графиката показва средният брой PI+ събития на секунда от района, определен на хистограмите (D). Отворените червени контури показват броят детергент-резистентни PI+ частици след третиране с 1% Triton X100. $n = 3$ ленти за грешка – стандартно отклонение.

До тук показаните резултати потвърждават хипотезата, че увреждане на ДНК в контекста на лизозомно инхибиране води до синергично усилена секреция на ИКВ и НК чрез активиране на неконвенционални секреторни пътища. Допълнителните експерименти с етопозид и BafA1 са индикация, че наблюдаваният ефект не е ограничен до специфичните биологични активности на TMZ или CHQ.

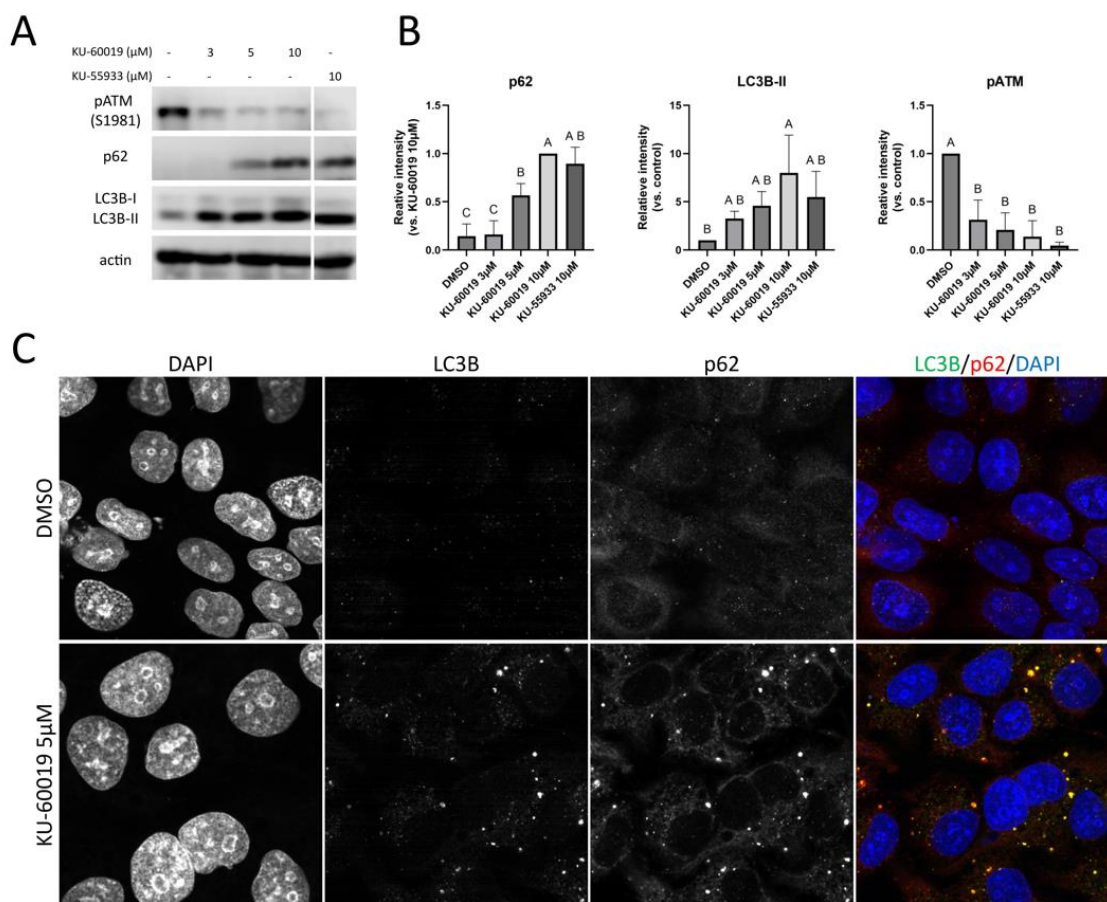
ATMi предизвикват натрупване на LC3B-II и p62 в HeLa Kyoto клетки

За да определим потенциала на KU-55933 и KU-60019 да инхибират автофагията на късен етап, HeLa Kyoto клетки бяха третирани с 10 μ M KU-55933, както и 1, 3, 5 и 10 μ M KU-60019 в продължение на 48 часа. Клетките бяха третирани в отсъствието на серум с цел поддържане на консистентни експериментални условия с последващи експерименти, където ИКВ щяха да бъдат изолирани от кондицирана среда. Според литературни данни KU-55933 значително намалява клетъчната преживяемост в условия на отсъствие на серум (или при нисък процент на такъв)¹⁴, и KU-60019 е по-ефективен и специфичен ATM инхибитор.¹⁵ Поради това, концентрациите на KU-60019 бяха титрувани и сравнени по отношение на тяхната способност да намаляват нивата на фосфо-ATM S1981 (pATM) и да инхибират автофагията, спрямо широко използвана концентрация KU-55933 за третиране с подобна продължителност.^{16 17 18 19} (Фигура 12 A, B).

Всички третиране доведоха до значително намаляване на нивата на pATM (S1981) в сравнение с контролата (Фигура 12 A). p62 беше акумулиран по зависим от дозата начин в клетки, третирани с концентрации KU-60019 по-високи от 5 μ M, както и такива

третиран с 10 μ M KU-55933. В концентрации от 10 μ M, KU-60019 и KU-55933 предизвикват подобни нива на акумулация на p62. LC3B-II също прояви дозозависима тенденция за акумулиране, но поради твърде високата вариация на нивата му между отделните повторения на експеримента, разликите между третиранията не са статистически значими.

За да потвърдим асоциацията на LC3B и p62 в автофагозоми, HeLa Kyoto клетки бяха третирани в идентични условия с контрола (0.1% DMSO) или 5 μ M KU-60019 и бяха оцветени с анти-p62 и анти-LC3B антитела (**Фигура 12 С**). KU-60019 предизвика концентриране на сигналите от p62 и LC3B във фокуси с висока степен на припокриване, което предполага, че фокусите от p62 се намират в лумена на автофагозоми или автолизозоми.



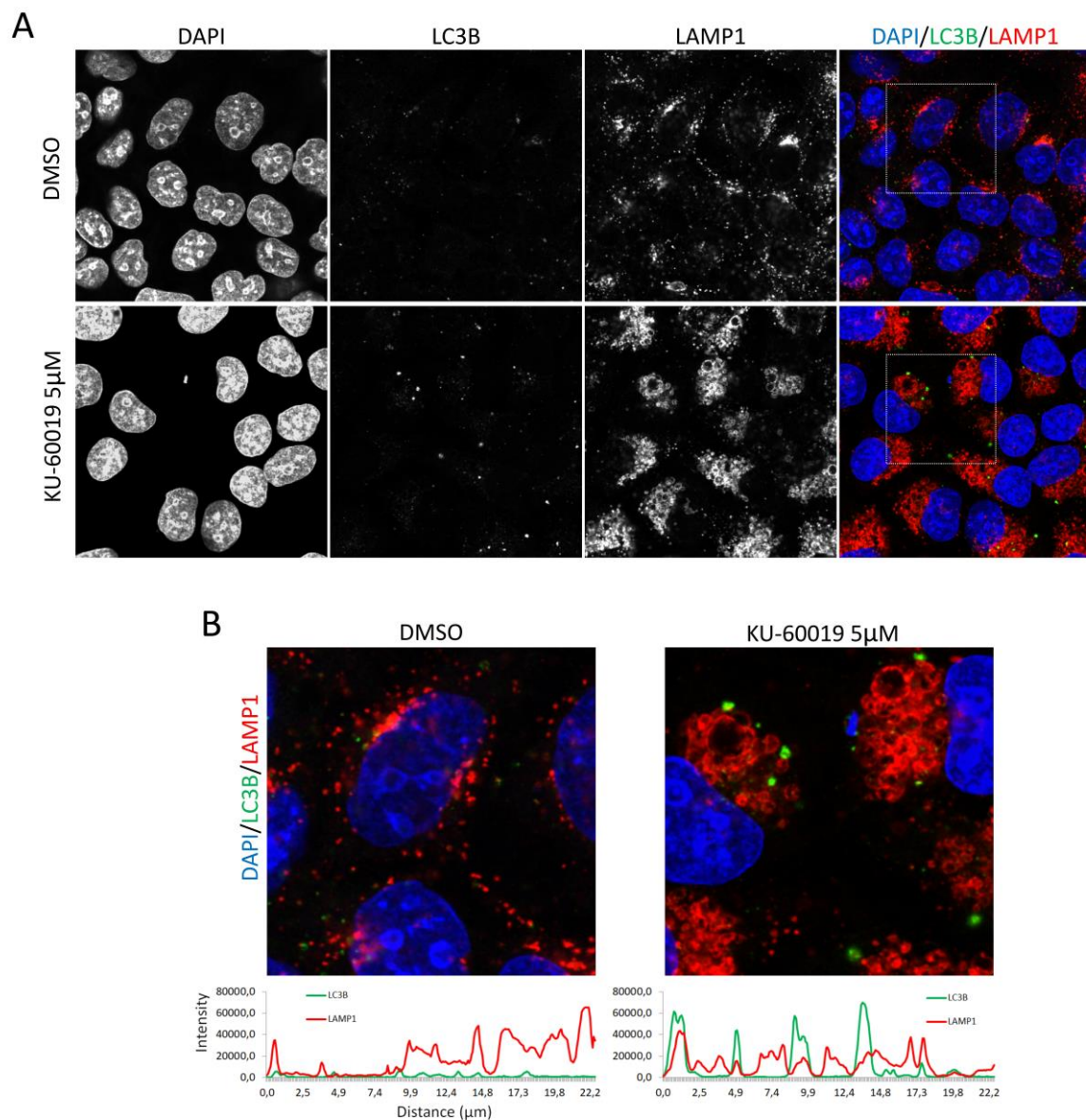
Фигура 12. *ATM* предизвикват натрупване на *LC3B-II* и *p62* в *HeLa Kyoto* клетки при отсъствие на серум

(**A** и **B**) – Western блот и денситометрия на проби от клетъчни лизати от *HeLa* клетки, третирани както е посочено, в продължение на 48 часа и при отсъствие на серум. Тъй като *p62* е почти недоловим в контролни проби, стойностите от денситометрията са представени като относителни към най-високия интензитет – *KU-60019* 10 μM . $N=3$; ленти за грешка – стандартно отклонение. Данните бяха анализирани с еднофакторен ANOVA и Tukey's post hoc test. Разликите в средни стойности на третирания, обозначени с една и съща буква, не са статистически значими, $p < 0.05$

(**C**) – Микроскопски изображения на *HeLa* клетки, третирани с DMSO или 5 μM *KU-60019*, в продължение на 48 часа и при отсъствие на серум. След третирането, клетките бяха фиксирани с метанол и бяха оцветени с DAPI, мише анти-*LC3B* и вторично Alexa Fluor 488, и заешко анти-*p62* и вторично Alexa Fluor 555 антитела.

KU-60019 предизвиква натрупване и уголемяване на лизозоми в HeLa Kyoto клетки при отсъствие на серум

За да проучим ефекта на KU-60019 върху лизозомите, HeLa Kyoto клетки бяха третирани с DMSO или 5 μ M KU-60019, подобно на предходния експеримент. Клетките бяха оцветени с анти-LC3B и анти-LAMP1 антитела (**Фигура 13**). KU-60019 предизвика уголемяване и акумулация на везикули с LAMP1 позитивни мембрани (лизозоми). В клетки третирани с KU-60019, фокуси от LC3B, особено в периферията на клетките, колокализираха с фокуси от LAMP1, което предполага или непълно блокиране на формирането на автолизозоми в тези условия, или лизофагия.²⁰



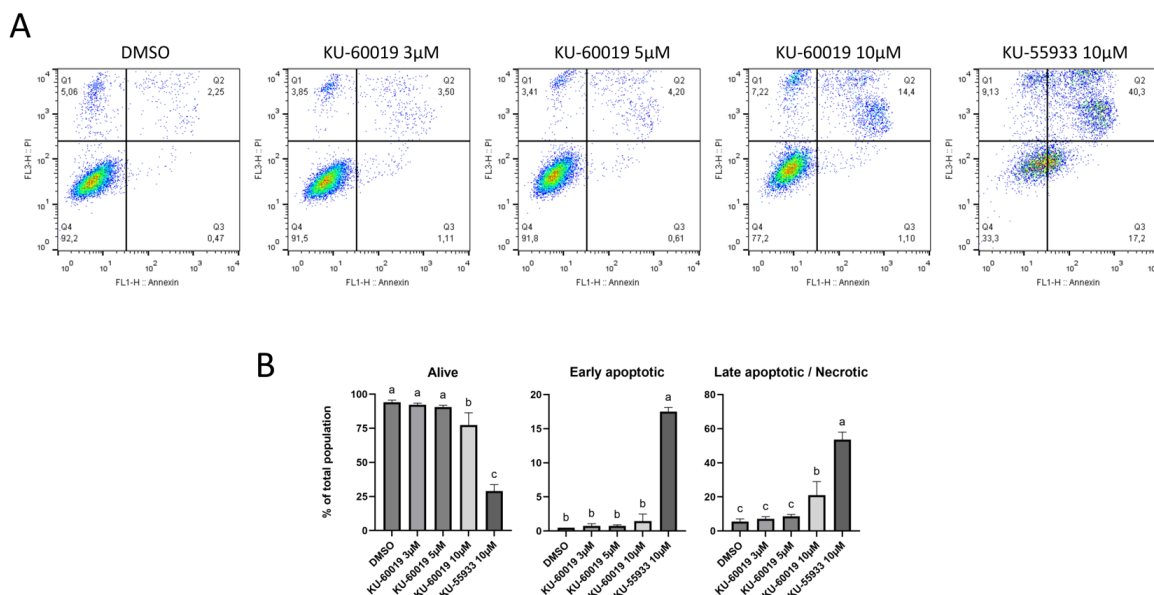
Фигура 13. KU-60019 предизвиква натрупване и уголемяване на лизозоми в HeLa Kyoto клетки при отсъствие на серум

(A) – Микроскопски изображения на HeLa клетки, третирани с DMSO или 5µM KU-60019 в продължение на 48 часа при отсъствие на серум. След третиране, клетките бяха фиксирани с метанол и бяха оцветени с DAPI, анти-LC3 и вторично Alexa Fluor 488 антитета, и анти-LAMP1 и вторично Alexa Fluor 488 антитета.

(B) – Увеличени изображения и профили с флуоресцентен интензитет.

KU-60019 (5 μ M) не повлиява значително клетъчната преживяемост при отсъствие на серум

Ефектите на гореспоменатите дози KU-60019 и KU-55933 върху клетъчната преживяемост при отсъствие на серум бяха изследвани чрез флоу-цитометрия и PI/Annexin V-FITC оцветяване (**Фигура 14**). KU-60019 не предизвика значително увеличение на клетъчна смъртност в концентрации до 5 μ M - над 90% от клетките при това третиране бяха жизнени (двойно негативни за PI и Annexin V). В концентрация от 10 μ M, KU-60019 намали процента на живите клетки до средно 77.5%, като 1.5% от клетките бяха позитивни само за Annexin, а 21% бяха позитивни за Annexin и PI. Еквивалентна концентрация (10 μ M) KU-55933 прояви значителна цитотоксичност – едва 28.9% от клетките останаха жизнени, 17.5% бяха позитивни за Annexin, и 53.6% бяха позитивни за Annexin и PI.



Фигура 14. KU-60019 (5 μ M) не повлиява значително клетъчната преживяемост при отсъствие на серум

Клетките бяха третирани както е обозначено в продължителност на 48 часа при отсъствие на серум. След третиране, клетките бяха оцветени с PI/Annexin V-FITC и анализирани с флоу-цитометрия.

A – Репрезентативни дот-плотове, илюстриращи стратегията за разделяне на живи (неоцветени, Q4), ранно апототъчни (Анексин-позитивни – Q3) и късно апототъчни или некротични клетки (Позитивни за пропидиев йодид – Q1 & Q2).

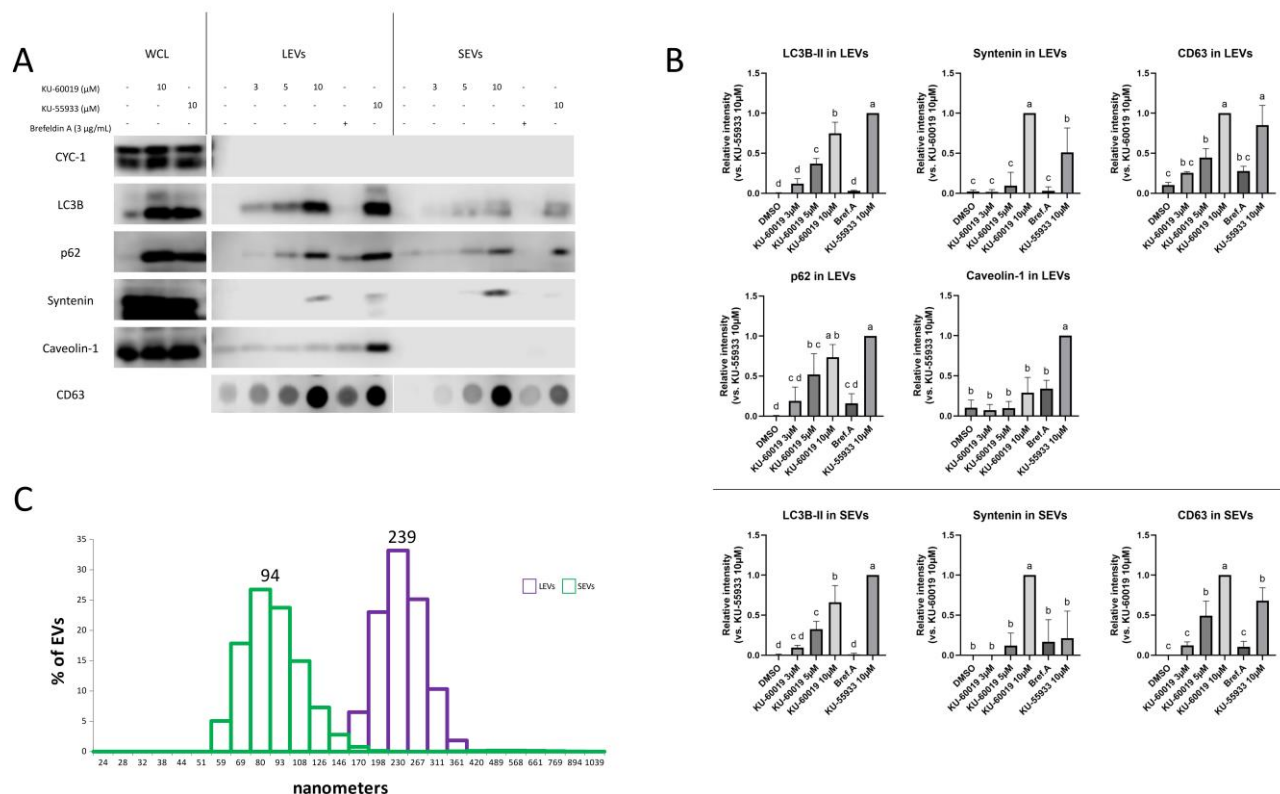
B - Хистограмите показват средния процент живи, ранно апототъчни и късно

апоптотъчни/некротични клетки след всяко от третиранията. N=3; ленти за грешка – стандартно отклонение. Данните бяха анализирани с еднофакторен ANOVA и Tukey's post hoc test. Разликите в средни стойности на третирания, обозначени с една и съща буква, не са статистически значими, $p < 0.05$

АТМ инхибиторите KU-60019 и KU-55933 индуцират секреция на малки и големи ИКВ, носещи автофагични маркери и такива, типични за класически екзозоми

HeLa Kyoto клетки бяха третирани с KU-60019, като в предходния експеримент. От кондиционирани супернатанти бяха изолирани големи и малки ИКВ чрез диференциално центрофугиране и PEG-преципитация. Резултатите показани във **Фигура 15** демонстрират, че KU-60019 индуцира дозозависима секреция на малки и големи ИКВ, съдържащи автофагични маркери (LC3B-II и p62), както и класически ИКВ маркери (syntenin и CD63), но не и митохондриалния маркер CYC-1. Клетки бяха третирани и с 10 μ M KU-55933 и Brefeldin A. За разлика от двата АТМ инхибитора, Brefeldin A не индуцира секреция на никой от изследваните маркери, което показва, че апоптозата вероятно не играе съществена роля в индуцираната от KU-55933 секреция на ИКВ. ИКВ пробите бяха анализирани и за присъствието на caveolin-1, като само 10 μ M KU-55933 индуцира значително повишение на секретирания caveolin-1 във фракцията от големи ИКВ. Доколкото ни е известно, това е първото публикувано изследване демонстриращо значителния капацитет на АТМ инхибитори да индуцират секреция на ИКВ.²¹

Размерът на секретирания ИКВ беше анализиран чрез DLS анализ. Размерите на изолираните малки ИКВ бяха в обхвата на 50-170 nm, а на големите – между 170-360 nm. Тези размери отговарят на очакваните за съответно екзозоми и микровезикули (**Фигура 15 С**). Бяха анализирани само проби от клетки, третирани с 5 μ M KU-60019, тъй като ИКВ маркерите в контролните проби бяха недоловими, което предполага много ниски базални нива на секреция.



Фигура 15. KU-60019 и KU-55933 индуцират секреция на малки и големи ИКВ, носещи автофагични маркери и такива, типични за класически екзозоми

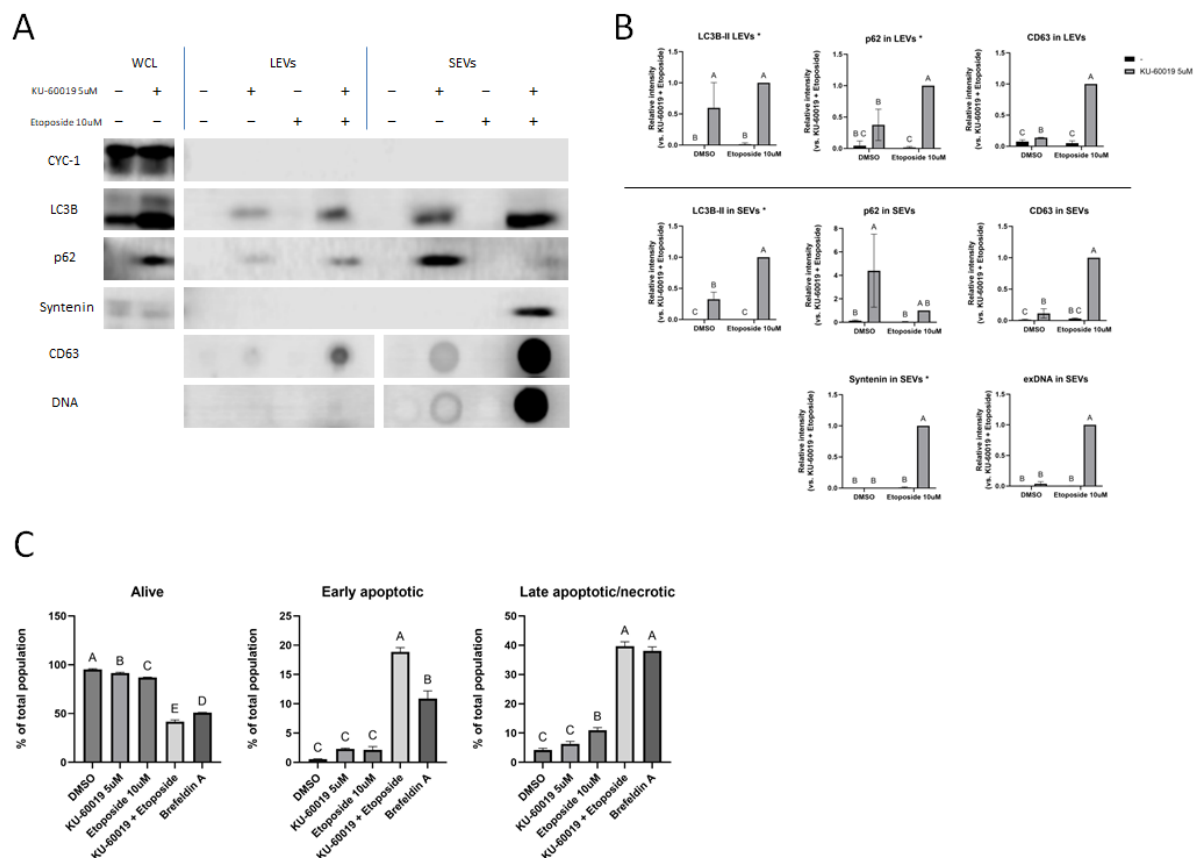
A и **B** – Western блот и денситометрия на големи и малки ИКВ от HeLa Kyoto клетки, третираны както е посочено, в продължение на 48 часа, при отсъствието на серум.

C – DLS анализ на големи и малки ИКВ от HeLa клетки, третираны с 5 μ M KU-60019 в продължение на 48 часа при отсъствието на серум.

Третиране с етопозид синергично увеличава индуцираната от KU-60019 секреция на големи и малки ИКВ, както и на извънклетъчна ДНК

Тъй като едно от основните приложения на АТМ инхибиторите е добавянето им към терапия с ДНК увреждащи агенти, изолирахме ИКВ от HeLa Kyoto клетки, третираны индивидуално с АТМ инхибитор, етопозид, както и комбинация от АТМ инхибитор + етопозид (**Фигура 16**). АТМ инхибиторът KU-60019 беше избран и използван в 5 μ M концентрация, тъй като в тази концентрация той предизвиква значително инхибиране на деградативната автофагия и намаляване на нивата на рАТМ (S1981) (**Фигура 12**). Етопозидът беше използван в 10 μ M концентрация. При тези концентрации, комбинирано третиране с KU-60019 и етопозид води до средно 39.6% позитивни за PI и Annexin клетки, което не се различава значително от третиране с Brefeldin A, където средно 38.1% от клетките са позитивни за PI и Annexin (**Фигура 16 C**).

Етопозидът сам по себе си не индуцира значителна секреция на нито един от наблюдаваните маркери или извънклетъчна ДНК. Добавянето му към третиране с KU-60019 обаче, значително и синергично повиши секрецията на p62 и CD63 в големи ИКВ, както и LC3B-II, syntenin, CD63 и извънклетъчна ДНК във фракцията от малки ИКВ (Фигура 16 А, В).



Фигура 16. Етопозид синергично увеличава индуцираната от KU-60019 секреция на големи и малки ИКВ, както и на извънклетъчна ДНК

(А и В) – Western блот и денситометрия на големи и малки ИКВ от HeLa Kyoto клетки, третирани както е посочено в продължение на 48 часа при отсъствието на серум. Данните бяха анализирани с двуфакторен ANOVA и Tukey's post hoc test.

(С) – Клетките бяха третирани както е посочено в продължение на 48 часа при отсъствието на серум. След третиране, клетките бяха оцветени с PI/Annexin V-FITC и анализирани с флоу-цитометрия. Хистограмите показват средния процент живи, ранно апоптотични и късно апоптотични/некротични клетки след всяко от третиранията. N=3; ленти за грешка – стандартно отклонение. Данните бяха анализирани с еднофакторен ANOVA и Tukey's post hoc test. Разликите в средни

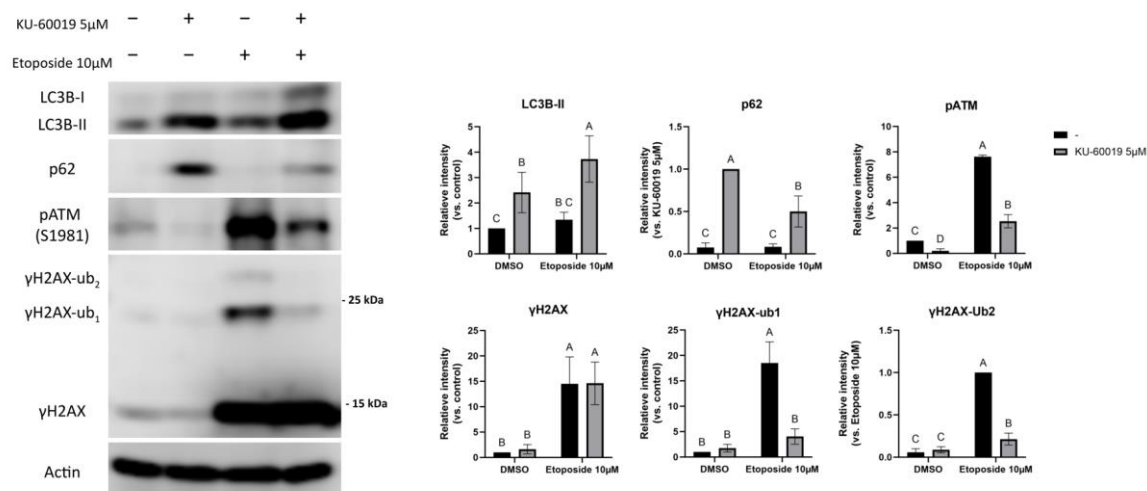
стойности на третирания обозначени с една и съща буква не са статистически значими, $p < 0.05$

Етопозидът намалява индуцираната от KU-60019 акумулация на p62; KU-60019 намалява убиквитинирането на γ H2AX

В клетъчни лизати от HeLa Kyoto третиран с контрола, ATM инхибитор, етопозид, и комбинация от ATM инхибитор + етопозид, етопозидът предизвиква значително увеличение на нивата на pATM (S1981) (Фигура 17). Въпреки че увеличението на нивата на pATM (S1981) е в значително по-ниска степен в клетки, третирани с комбинацията, в сравнение с такива, третирани само с етопозид, нивата на γ H2AX не бяха значително повлияни от KU-60019.

Етопозидът прояви обратни ефекти върху акумулацията на LC3B-II и p62, предизвикана от KU-60019 – добавянето на етопозид увеличи акумулацията на LC3B-II, като същевременно намали тази на p62.

Въпреки това, в сравнение с клетки третирани с единствено етопозид, комбинацията от KU-60019 и етопозид доведе до акумулация на p62, която вероятно е отговорна за наблюдаваното намаляване на убиквитиниран γ H2AX (γ H2AX-Ub).²²



Фигура 17. Етопозидът намалява индуцираната от KU-60019 акумулация на p62; KU-60019 намалява убиквитинирането на γ H2AX

Western блот и денситометрия на проби от клетъчни лизати от HeLa Kyoto, третирани както е посочено, в продължение на 48 часа, при отсъствието на серум. $N=3$; ленти за грешка – стандартно отклонение. Данните бяха анализирани с двуфакторен ANOVA и Данните бяха анализирани с двуфакторен ANOVA и Tukey's

post hoc test. Разликите в средни стойности на третирания обозначени с една и съща буква не са статистически значими, $p < 0.05$

Дискусия

Взаимодействие между ДНК-увреждащи агенти и автофагични инхибитори в секрецията на ИКВ

Резултатите от настоящия труд показват капацитета на комбинирано третиране с автофагични инхибитори и ДНК увреждащи агенти за синергично индуциране на секреция на ИКВ и нуклеинови киселини . Експериментите с функционални аналози (замяната на темозоломид с етопозид и на хлорохин с бафиломицин) демонстрират, че ефектът не се дължи на странична биологична активност, специфична за темозоломид или хлорохин.

Ефектът се проявява и при замяна на инхибиторите на късна автофагия (хлорохин или бафиломицин) с инхибитори на АТМ, които инхибират автофагията по различни механизми и на различни етапи. Това показва, че наблюдаваният ефект вероятно се проявява универсално при увреждане на ДНК в контекста на инхибиране на късна автофагия, или автофагия като цяло.

Участието на автофагията в секрецията на ИКВ и частици е добре известно.^{23 24 25} Предположена е и Rab27a-зависима секреция на материал с произход от автофагозоми, както и класически екзосоми с произход от мултивезикуларни тела, при нарушено зреене на автофагозомите.²⁶ В тази статия, за разлика от резултатите от настоящия труд, е наблюдавано значително индуциране на секреция на ИКВ от хлорохин. Вероятно обяснение за това различие е използването на значително по-висока доза хлорохин (25 μM) в сравнение с използваната от нас – 10 μM .

Докладваните IC_{50} стойности на темозоломид и хлорохин варират значително в зависимост от вида на теста, наличието на серум, и продължителността на третирането. В глиомни модели, хлорохин обикновено проявява цитотоксични ефекти при концентрации надвишаващи 10 μM , като често е използван в концентрация от 10 μM в механистични проучвания като автофагичен инхибитор. Показано е индуцирането на

апоптоза в култури от глиомни клетки от концентрации хлорохин надвишаващи 10 $\mu\text{g/mL}$.²⁷

За U87-MG, докладваните за темозоломид IC_{50} стойности са в обхвата $\sim 100\text{-}300 \mu\text{M}$ след третиране от 24 до 72 часа, докато U138-MG са забележително по-резистентни – с IC_{50} стойности за темозоломид в определени условия приближаващи 1mM.⁵ Следователно нашите условия за третиране (400 μM TMZ, 10 μM CHQ) представляват същевременно супра- IC_{50} доза темозоломид за чувствителната (U87-MG) и суб- IC_{50} доза темозоломид за резистентната (U87-MG) глиобластомна линия, което е в съответствие с наблюденията ни. Иползваната от нас доза хлорохин е в обхвата на често използваните дози за инхибиране на автофагията.

Апоптозата не допринася за наблюдаваната секреция на ИКВ

Активната секреция на ИКВ може да бъде замаскирана от високи нива на апоптоза, поради освобождаване на апоптотъчни тела с размерни разпределения припокриващи се с тези на класическите микровезикули и екзозоми.²⁸ В U87-MG клетки е слабо вероятно синергичното индуциране на секреция на ИКВ от темозоломид и хлорохи да е зависимо от апоптоза, тъй като при тези условия хлорохин не усилва цитотоксичния ефект на темозоломид. В сравнение с U87-MG, U138-MG клетките са по-резистентни към темозоломид (**Фигура 1**), като при тях хлорохин усилва цитотоксичния ефект на темозоломид. Въпреки това, и при U138-MG е слабо вероятно усилената апоптоза да е повлияла значително на наблюдаваното индуциране на секреция на LC3B-II, p62 и кавеолин, тъй като в пробите от ИКВ не се засича цитохром C1 – маркер за замърсяване с клетъчни отломки (**Фигура 5**).

Присъствие на кавеолин в ИКВ фракциите и механизъм на неговата секреция

Интересно наблюдение в настоящия труд е синергичното индуциране от темозоломид и хлорохин на секреция на кавеолин-1 във фракцията от малки ИКВ (**Фигури 2 и 5**). В напреднал стадии на ракови заболявания, включително и мултиформен глиобластом, експресията на кавеолин-1 корелира със степента на тумора, и допринася към неговата агресивност и резистентност към терапия.²⁹ Кавеолин-1 е мембранен протеин, присъстващ в големи ИКВ и произхождащи от плазмената мембрана онкозоми.³⁰ Обогатен е и в екзозоми изолирани от серум на пациенти с мултиформен глиобластом,

в сравнение с такива изолирани от здрави контроли.³¹ Предполагам механизъм за биогенезата на кавеолин-1 съдържащи ИКВ е секреторна автофагия³², като данните от настоящия труд подкрепят този модел – именно наблюдаваната хлорохин-зависима секреция на кавеолин-1 съдържащи малки ИКВ и индуцираното от хлорохин акумулиране на кавеолин-1 в големи амфизоми/автолизозоми (**Фигура 7**).

Взаимодействие между ДНК-увреждащи агенти и автофагични инхибитори в освобождаването на нуклеинови киселини

В допълнение към действието му като лизозомен инхибитор, хлорохин има ДНК-интеркалиращо действие, което предизвиква промяна в структурата на ДНК и като последици от това – активиране на АТМ при отсъствието на ДНК увреждания.³³ Демонстрирано е и че при концентрацията, използвана в настоящия труд (10 μ M), хлорохин не води до увреждане, а стимулира поправката на ДНК.³⁴ Това би могло да обясни наблюдаваното несъответствие – повишени нива γ H2AX при добавяне на хлорохин към третирането с темозоломид, без увеличаване на количеството увредена ДНК в клетката (**Фигура 10**). Възможно е и малки увеличения в количеството увредена ДНК при третиране с комбинация от темозоломид и хлорохин да не могат да бъдат засечени с кометния анализ. Въпреки това, фрагментирани извънклетъчни ДНК-, както и РНК молекули бяха налични в кондицирани супернатанти, а индуцираната от темозоломид секреция на асоциирани с ИКВ и частици извънклетъчни нуклеинови киселини беше синергично увеличена от прибавяне на хлорохин към третирането (**Фигура 11**). В това отношение, настоящият труд е допълнение към увеличаващия се брой проучвания, които демонстрират взаимовръзката между отговора към увреждане на ДНК и секрецията на ИКВ, а именно – че увреждане на ДНК може да повлияе на секрецията и композицията на ИКВ и обратното – ИКВ могат да повлияят на регулацията на отговора към увреждане на ДНК.³⁵

Увредената ядрена ДНК активно бива трансферирана към цитоплазмата, където може да бъде премахната от клетката чрез зависима- и независима от автофагията неконвенционална секреция.^{36 37} Известна е способността на ИКВ, включително екзозоми, да осъществяват износ на увредена ДНК и ДНК-РНК хибриди^{38 39} Акумулацията на ДНК и двойно-верижна РНК в цитоплазмата може да активира цитотоксични, възпалителни процеси посредством cGAS-STING и RIG-I/MDA, водещи до сенесцентност.^{40 41} Активираният от темозоломид отговор към увреждане на ДНК

(DNA damage response –DDR) води до индуциране на цитопротективна автофагия.⁴² В допълнение към облекчаването на вредните ефекти на сигнализацията, активирана от цитоплазматична ДНК, секреторната автофагия и секрецията на ИКВ допринасят за резистентността към генотоксични агенти чрез усилване на техния ефлукс.⁴³ В контекста на лизозомно инхибиране, елиминирането на увредени нуклеинови киселини посредством засилена секреторна автофагия би могло да обясни наблюдаваната синергия.

Влияние на ATM инхибитори върху автофагията и клетъчната преживяемост

Доколкото ни е известно, в настоящия труд за първи път е показан капацитетът на ATM инхибиторите да индуцират интензивна секреция на ИКВ (**Фигура 15**), както и тяхното комплексно взаимодействие с генотоксичния агент етопозид по отношение на индукция на ИКВ (**Фигура 16**) и акумулация на автофагични маркери в клетките (**Фигура 17**).

Познато е, че инхибиране или дисфункция на ATM киназата води до нарушение на автофагията, но ефектът върху акумулацията на автофагични маркери (LC3B-II и p62) изглежда зависим от контекста. Според един доклад, кратко (4 часово) третиране с висока доза (100 μ M) KU-55933 намалява нивата на LC3B-II в сърдечни фибробласти при отсъствие на серум.⁴⁴ Друг екип наблюдава увеличение на нивата на LC3B-II и фокусите от p62, въпреки цялостно намаляване на нивата на p62 в ATM-/- клетки, както и акумулация на LC3B-II при третиране на нормални клетки с KU-60019 в продължение на 24 часа.⁴⁵ Трета група докладва акумулация на LC3B-II и p62 в HeLa клетки след 24 часово третиране с KU-55933 или KU-60019 (10 μ M) в присъствие на 10% серум и потвърждават ролята на ATM киназата в този процес, като наблюдават акумулация на двата автофагични маркера и след третиране със siRNA срещу ATM.¹⁴

Изборът на клетъчна линия за експериментите с ATM инхибитори беше информиран от третия доклад, който служи като основа, изучавайки капацитета на ATM инхибиторите да инхибират късна автофагия в HeLa клетки. Въпреки разлики в експериментални условия между нашата работа и гореспоменатия доклад, като по-дълго третиране (48 часа вместо 24 часа) и отсъствие на серум (вместо 10% такъв), нашите резултати са в съответствие – наблюдаваме дозозависима акумулация на LC3B-II и p62 в HeLa клетки при третирането им с KU-55933 или KU-60019, като и двата инхибитора предизвикват

съпоставими нива на акумулация на автофагичните маркери при концентрации от 10 μM (**Фигура 12**). Това се случва независимо от различия в експерименталните условия между нашите експерименти и тези от гореспоменатото проучване, като по-дългото ни третиране (48 часа вместо 24) и отсъствието на серум (вместо третиране при наличие на 10% серум).

Предполагаме механизъм, посредством който KU-60019 би могъл да наруши автофагията е чрез инхибиране на формирането на автолизозоми, демонстрирано от намалената колокализация на LAMP1 и LC3 след третиране с KU-60019 при наличието на 10% серум в продължителност на 24 часа, в сравнение с третиране с хлорохин.¹⁴

Въпреки че нашите експерименти с АТМ инхибитори не включват хлорохин, което не ни позволява да потвърдим дали това би се случило и при нашите експериментални условия - отсъствие на серум, по-продължително, 48 часово третиране (вместо 24 часово) и по-ниска доза KU-60019 (5 μM вместо 10 μM), ние наблюдаваме колокализация на LAMP1 с най-интензивните фокуси от LC3 в перифериите на клетки третирани с KU-60019 (**Фигура 13**). Това обаче не ни позволява да разграничим между непълно инхибиране на формирането на автолизозоми и потенциална лизофагия.²⁰

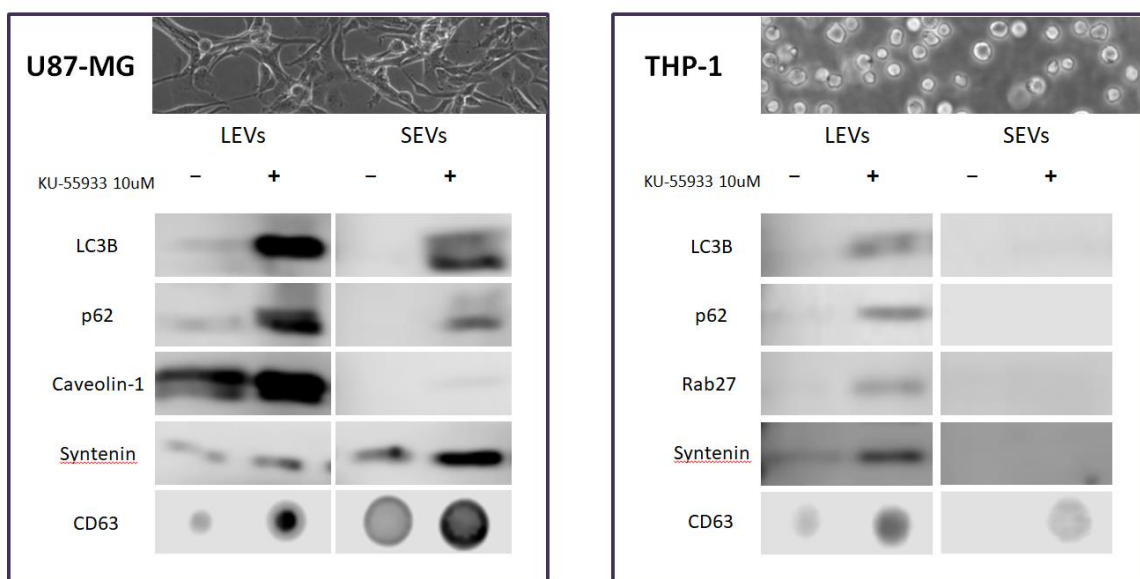
Наблюдавахме и увеличение на броя и размера на лизозомите при третиране с KU-60019 (**Фигура 13**), което е в съответствие с докладваното увеличение на броя на лизозомите и дефектите в тяхната подвижност при неврони от мишки с дефицит на АТМ.⁴⁵

Показано е значително намаляване на клетъчната преживяемост след третиране с KU-55933 при ниско съдържание на серум или при отсъствието на такъв.¹⁴ При нашето директно сравнение чрез оцветяване с пропидиев йодид и анексин, KU-55933 прояви значително по-силна цитотоксичност от KU-60019 при една и съща концентрация (10 μM) (**Фигура 14**). Въпреки докладваната съпоставима специфичност на двата инхибитора към АТМ¹⁵, възможно обяснение за този резултат би могла да бъде проявата неизследвани странични ефекти.

KU-55933 и KU-60019 индуцират секреция на ИКВ

Както KU-55933, така и KU-60019 индуцират секреция на ИКВ, позитивни за LC3B-II и p62 от HeLa клетки, което предполага автофагозомния произход на тези везикули (Фигура 15). Наличието на синтенин предполага, че екзозоми с произход от мултивезикуларни тела са част от секретираниите везикули.⁴⁶ Забележително, само KU-55933 индуцира секреция на caveolin-1, чиито нива в туморната микросреда корелират с прогресията на заболяването.²⁹ Тъй като KU-60019 е с подобрени фармакокинетични свойства и бива изследван с туморни проби от пациенти⁴⁷, липсата на значително увеличение в секрецията на caveolin-1 при третиране с концентрации до 10 μ M е обнадеждаващ признак.

Индуцираната от АТМ инхибитори секреция на ИКВ не е специфична за HeLa клетки. Тя се наблюдава и при третиране на две други клетъчни линии с KU-55933 – THP-1 и U87-MG (Фигура 18).



Фигура 18. Индуциране на секреция на малки и големи ИКВ от U87-MG и THP-1 клетки, третирани с 10 μ M KU-55933 за 48 часа, подобно на експериментите с HeLa.

Добавянето на етопозид при третиране с KU-60019 предизвика синергично увеличение на индуцираната от последния секреция на LC3B-II, syntenin, CD63 и извънклетъчна ДНК (**Фигура 16**). Това е в съответствие с наблюденията от експериментите с глиобластомни клетки. За разлика от LC3B-II, секрецията на p62 беше синергично увеличена само във фракцията на големите ИКВ, докато в тази на малки ИКВ, прибавянето на етопозид прояви тенденция за намаляване на индуцираната от KU-60019 секреция на p62. Това несъответствие вероятно е обвързано с негативния ефект на етопозид върху индуцираната от KU-60019 експресия на p62, което е разгледано в детайли по-надолу.

Нарушенията на автофагията, предизвикани от АТМ инхибиторите допринасят за потискащото им влияние върху поправката на ДНК

Както беше очаквано, KU-60019 значително намали индуцираното от етопозид автофосфорилиране на АТМ (**Фигура 17**). Въпреки че АТМ е една от киназите, отговорни за фосфорилирането на H2AX на ser139,⁴⁸ нивата на γ H2AX не бяха повлияни от KU-60019. Възможно обяснение за това би могло да е наличието на непоправени двойноверижни скъсвания на ДНК в следствие от инхибирането на АТМ,⁴⁹ или формиране на γ H2AX вследствие от асоциирано с апоптоза фрагментиране на ДНК.⁵⁰

Важно наблюдение е проявения от KU-60019 негативен ефект върху индуцираното от етопозид убиквитилиране на γ H2AX. Именно убиквитилираният γ H2AX (γ H2AX-Ub) е специфичен маркер за двойноверижни скъсвания и неговото формиране е необходимо за активиране на тяхната поправка.⁵¹ Това би могло да бъде обяснено от индуцираната от KU-60019 акумулация на p62, тъй като p62 подтиска убиквитилирането на γ H2AX, като свързва и инактивира убиквитин лигазата RNF168.²² Също така, p62 може да забави разрешаването на фокуси на ДНК увреждания, както и да промотира протеазомната деградация на протеини участващи в поправка на ДНК.⁵² Следователно наблюдаваната, индуцирана от KU-60019 акумулация на p62 би могла да е един от пътищата по които този инхибитор възпрепятства поправката на ДНК.

В клетки третирани с KU-60019, намаляването на акумулацията на p62 от етопозид би могло да е резултат от убиквитилиране и протеазомна деградация на p62,⁵³ вероятно като компенсаторен механизъм, чрез който клетката да противодейства на

гореспоменатото, предизвикано от p62 нарушение на ДНК поправката. Възможно е този процес да е зависим от ATM, тъй като подобна компенсация не се наблюдава при комбиниране на ДНК-увреждащи агенти с хлорохин или бафиломицин А. Резултатите, представени в този раздел, биха могли да послужат за база на по-нататъшни, детайлни проучвания върху взаимовръзката между автофагията и регулацията на механизмите на ДНК поправката.

Изводи

- При селектираните експериментални условия, CHQ сенсibiliзира TMZ-резистентните U138-MG клетки, но не и TMZ-чувствителните U87-MG клетки към TMZ
- При U87-MG клетки, синергично-индуцираните от CHQ и TMZ секреция на ИКВ и НК, и отговор към увреждане на ДНК, не корелират с проапоптотичната активност на комбинираното третиране – индикатор за активиране на неконвенционални секреторни механизми
- CHQ и TMZ синергично индуцират натрупване на автофагични маркери в клетъчни лизати, което вероятно се дължи не само на блокирана лизозомна функция, но и на активиран автофагичен флукс
- Синергичната секреция на ИКВ и НК вероятно се дължи на ДНК увреждане в контекста на лизозомно инхибиране, а не на странични функции на CHQ и TMZ, тъй като се наблюдава и с алтернативен автофагичен инхибитор и генотоксичен агент (Bafilomycin and etoposide)
- CHQ води до натрупване на caveolin в лумена на автофагозоми/амфизоми, показващо взаимодействие между механизми на ендоцитоза и автофагия
- Присъствието на caveolin във фракцията от малки ИКВ при третиране с CHQ и TMZ подчертава **патологичния потенциал на секретирания ИКВ**
- ATMi KU-60019 и KU-55933 инхибират автофагията на късен етап
- ATMi KU-60019 и KU-55933 индуцират секреция на ИКВ и ДНК
- ATMi KU-60019 и KU-55933 и етопозид синергично индуцират секреция на ИКВ и НК, което затвърждава посочените по-горе изводи
- **Инхибитори на деградативна автофагия и ДНК увреждащи агенти синергично индуцират секреция на ИКВ и НК**

Публикации по темата на дисертацията:

Aleksander Emilov Aleksandrov, Banko Ivaylov Bankov , Vera Lyubchova Djeliova, Georgi Georgiev Antov, Svetozar Stoichev, Roumyana Silvieva Mironova, Dimitar Borisov Iliev, **Synergistic Upregulation of Extracellular Vesicles and Cell-Free Nucleic Acids by Chloroquine and Temozolomide in Glioma Cell Cultures** *Int J Mol Sci.* 2025 Oct 4;26(19):9692. doi: [10.3390/ijms26199692](https://doi.org/10.3390/ijms26199692)

Aleksander Emilov Aleksandrov, Dimitar Borisov Iliev, Banko Ivaylov Bankov, Georgi Georgiev Antov, Svetozar Stoichev, **ATM Inhibitor KU-60019 Induces Extracellular Vesicle Secretion in HeLa Cells** – *European Journal of Biology, EJB* 2026, 85 (2): 1–11; <https://doi.org/10.26650/EurJBiol.2026.1869737>

Участия в научни конференции:

Irina Georgieva, Aleksander Aleksandrov, Radoslav Aleksandrov, Dimitar Iliev
Context-dependent modulation of extracellular vesicle secretion by ATM inhibition and Temozolomide in cancer cells
(Poster presentation) 30th European Cell Death Organization Conference 9-11 October 2024

Dimitar Iliev, Aleksander Aleksandrov
Synergistic induction of extracellular vesicles by a DNA alkylating agent and autophagy inhibitors in glioma cell cultures
(Oral presentation) 100th anniversary of the birth of Acad. Roumen Tsanev

Aleksander Aleksandrov, Dimitar Iliev, Roumyana Mironova, Yordan Handzhiyski
Characterization of extracellular vesicles released by glioblastoma multiforme (GBM) cells (U87-MG)
(Poster presentation) 8th National Conference with International Participation “Morphological Days”

Библиография

1. Rider MA, Hurwitz SN, Meckes DG, Jr. Extrapep: A polyethylene glycol-based method for enrichment of extracellular vesicles. *Sci Rep*. 2016;6:23978. doi:10.1038/srep23978
2. Collins A, Møller P, Gajski G, Vodenková S, Abdulwahed A, Anderson D, et al. Measuring DNA modifications with the comet assay: A compendium of protocols. *Nat Protoc*. 2023;18(3):929-989. doi:10.1038/s41596-022-00754-y
3. Singh NP, Tice RR, Stephens RE, Schneider EL. A microgel electrophoresis technique for the direct quantitation of DNA damage and repair in individual fibroblasts cultured on microscope slides. *Mutat Res*. 1991;252(3):289-296. doi:10.1016/0165-1161(91)90008-v
4. Końca K, Lankoff A, Banasik A, Lisowska H, Kuszewski T, Gózdź S, et al. A cross-platform public domain pc image-analysis program for the comet assay. *Mutat Res*. 2003;534(1-2):15-20. doi:10.1016/s1383-5718(02)00251-6
5. Lee SY. Temozolomide resistance in glioblastoma multiforme. *Genes Dis*. 2016;3(3):198-210. doi:10.1016/j.gendis.2016.04.007
6. Morello M, Minciaccchi VR, de Candia P, Yang J, Posadas E, Kim H, et al. Large oncosomes mediate intercellular transfer of functional microrna. *Cell Cycle*. 2013;12(22):3526-3536. doi:10.4161/cc.26539
7. Pommepuy I, Terro F, Petit B, Trimoreau F, Bellet V, Robert S, et al. Brefeldin a induces apoptosis and cell cycle blockade in glioblastoma cell lines. *Oncology*. 2003;64(4):459-467. doi:10.1159/000070307
8. Chardin P, McCormick F. Brefeldin a: The advantage of being uncompetitive. *Cell*. 1999;97(2):153-155. doi:10.1016/S0092-8674(00)80724-2
9. Lee SS, Won JH, Lim GJ, Han J, Lee JY, Cho KO, et al. A novel population of extracellular vesicles smaller than exosomes promotes cell proliferation. *Cell Commun Signal*. 2019;17(1):95. doi:10.1186/s12964-019-0401-z
10. Purhonen P, Pursiainen K, Reunanen H. Effects of brefeldin a on autophagy in cultured rat fibroblasts. *Eur J Cell Biol*. 1997;74(1):63-67.
11. Baldwin EL, Osheroff N. Etoposide, topoisomerase ii and cancer. *Curr Med Chem Anticancer Agents*. 2005;5(4):363-372. doi:10.2174/1568011054222364
12. Hu T, Li P, Luo Z, Chen X, Zhang J, Wang C, et al. Chloroquine inhibits hepatocellular carcinoma cell growth in vitro and in vivo. *Oncol Rep*. 2016;35(1):43-49. doi:10.3892/or.2015.4380
13. Jeppesen DK, Fenix AM, Franklin JL, Higginbotham JN, Zhang Q, Zimmerman LJ, et al. Reassessment of exosome composition. *Cell*. 2019;177(2):428-445.e418. doi:10.1016/j.cell.2019.02.029
14. Hwang M, Jun DW, Song BR, Shim H, Lee CH, Kim S. Ataxia-telangiectasia mutated is involved in autolysosome formation. *Biomol Ther (Seoul)*. 2023;31(5):559-565. doi:10.4062/biomolther.2023.003
15. Golding SE, Rosenberg E, Valerie N, Hussaini I, Frigerio M, Cockcroft XF, et al. Improved atm kinase inhibitor ku-60019 radiosensitizes glioma cells, compromises insulin, akt and erk prosurvival signaling, and inhibits migration and invasion. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2009;8(10):2894-2902. doi:10.1158/1535-7163.Mct-09-0519
16. Zhang A, Zhang L, Xie X, Liu D. Inhibition of atm with ku-55933 sensitizes endometrial cancer cell lines to olaparib. *Onco Targets Ther*. 2023;16:1061-1071. doi:10.2147/ott.S426923
17. Wang J, Li L, Qin Y, Zhang W. Tti1 contributes to radioresistance by activating atm pathway in rectal cancer. *Journal of Translational Medicine*. 2025;23(1):652. doi:10.1186/s12967-025-06648-3
18. Shah P, McGuigan CW, Cheng S, Vanpouille-Box C, Demaria S, Weiss RS, et al. Atm modulates nuclear mechanics by regulating lamin a levels. Original Research. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2022;Volume 10 - 2022doi:10.3389/fcell.2022.875132

19. Liu J, Liu Y, Meng L, Ji B, Yang D. Synergistic antitumor effect of sorafenib in combination with atm inhibitor in hepatocellular carcinoma cells. *Int J Med Sci.* 2017;14(6):523-529. doi:10.7150/ijms.19033
20. Papadopoulos C, Kravic B, Meyer H. Repair or lysophagy: Dealing with damaged lysosomes. *Journal of Molecular Biology.* 2020;432(1):231-239. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.08.010>
21. Aleksandrov A, Iliev D, Bankov B, Antov G, Stoichev S. Atm inhibitor ku-60019 induces extracellular vesicle secretion in hela cells. *European Journal of Biology.* 2019;doi:10.26650/EurJBiol.2026.1869737
22. Wang Y, Zhang N, Zhang L, Li R, Fu W, Ma K, et al. Autophagy regulates chromatin ubiquitination in DNA damage response through elimination of sqstm1/p62. *Mol Cell.* 2016;63(1):34-48. doi:10.1016/j.molcel.2016.05.027
23. Hessvik NP, Øverbye A, Brech A, Torgersen ML, Jakobsen IS, Sandvig K, et al. Pikfyve inhibition increases exosome release and induces secretory autophagy. *Cell Mol Life Sci.* 2016;73(24):4717-4737. doi:10.1007/s00018-016-2309-8
24. Leidal AM, Huang HH, Marsh T, Solvik T, Zhang D, Ye J, et al. The lc3-conjugation machinery specifies the loading of rna-binding proteins into extracellular vesicles. *Nat Cell Biol.* 2020;22(2):187-199. doi:10.1038/s41556-019-0450-y
25. Miranda AM, Lasiecka ZM, Xu Y, Neufeld J, Shahriar S, Simoes S, et al. Neuronal lysosomal dysfunction releases exosomes harboring app c-terminal fragments and unique lipid signatures. *Nat Commun.* 2018;9(1):291. doi:10.1038/s41467-017-02533-w
26. Solvik TA, Nguyen TA, Tony Lin YH, Marsh T, Huang EJ, Wiita AP, et al. Secretory autophagy maintains proteostasis upon lysosome inhibition. *J Cell Biol.* 2022;221(6)doi:10.1083/jcb.202110151
27. Kim EL, Wüstenberg R, Rübsam A, Schmitz-Salue C, Warnecke G, Bückner EM, et al. Chloroquine activates the p53 pathway and induces apoptosis in human glioma cells. *Neuro Oncol.* 2010;12(4):389-400. doi:10.1093/neuonc/nop046
28. Kakarla R, Hur J, Kim YJ, Kim J, Chwae YJ. Apoptotic cell-derived exosomes: Messages from dying cells. *Exp Mol Med.* 2020;52(1):1-6. doi:10.1038/s12276-019-0362-8
29. Ketteler J, Klein D. Caveolin-1, cancer and therapy resistance. *Int J Cancer.* 2018;143(9):2092-2104. doi:10.1002/ijc.31369
30. Di Vizio D, Morello M, Dudley AC, Schow PW, Adam RM, Morley S, et al. Large oncosomes in human prostate cancer tissues and in the circulation of mice with metastatic disease. *Am J Pathol.* 2012;181(5):1573-1584. doi:10.1016/j.ajpath.2012.07.030
31. Kucharzewska P, Christianson HC, Welch JE, Svensson KJ, Fredlund E, Ringnér M, et al. Exosomes reflect the hypoxic status of glioma cells and mediate hypoxia-dependent activation of vascular cells during tumor development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(18):7312-7317. doi:10.1073/pnas.1220998110
32. Ariotti N, Wu Y, Okano S, Gambin Y, Follett J, Rae J, et al. An inverted cav1 (caveolin 1) topology defines novel autophagy-dependent exosome secretion from prostate cancer cells. *Autophagy.* 2021;17(9):2200-2216. doi:10.1080/15548627.2020.1820787
33. Bakkenist CJ, Kastan MB. DNA damage activates atm through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature.* 2003;421(6922):499-506. doi:10.1038/nature01368
34. Qian M, Liu Z, Peng L, Tang X, Meng F, Ao Y, et al. Boosting atm activity alleviates aging and extends lifespan in a mouse model of progeria. *Elife.* 2018;7doi:10.7554/eLife.34836
35. Han J, Xu K, Xu T, Song Q, Duan T, Yang J. The functional regulation between extracellular vesicles and the DNA damage responses. *Mutat Res Rev Mutat Res.* 2025;795:108532. doi:10.1016/j.mrrev.2025.108532
36. Clancy JW, Sheehan CS, Boomgarden AC, D'Souza-Schorey C. Recruitment of DNA to tumor-derived microvesicles. *Cell Rep.* 2022;38(9):110443. doi:10.1016/j.celrep.2022.110443
37. Bartsch K, Knittler K, Borowski C, Rudnik S, Damme M, Aden K, et al. Absence of rnase h2 triggers generation of immunogenic micronuclei removed by autophagy. *Hum Mol Genet.* 2017;26(20):3960-3972. doi:10.1093/hmg/ddx283

38. Tesei A, Arienti C, Bossi G, Santi S, De Santis I, Bevilacqua A, et al. Tp53 drives abscopal effect by secretion of senescence-associated molecular signals in non-small cell lung cancer. *J Exp Clin Cancer Res.* 2021;40(1):89. doi:10.1186/s13046-021-01883-0
39. Takahashi A, Okada R, Nagao K, Kawamata Y, Hanyu A, Yoshimoto S, et al. Exosomes maintain cellular homeostasis by excreting harmful DNA from cells. *Nat Commun.* 2017;8:15287. doi:10.1038/ncomms15287
40. Chatzidoukaki O, Stratigi K, Goulielmaki E, Niotis G, Akalestou-Clocher A, Gkirtzimanaki K, et al. R-loops trigger the release of cytoplasmic ssDNA leading to chronic inflammation upon DNA damage. *Sci Adv.* 2021;7(47):eabj5769. doi:10.1126/sciadv.abj5769
41. Ghosh R, Roy S, Franco S. Parp1 depletion induces rig-i-dependent signaling in human cancer cells. *PLoS One.* 2018;13(3):e0194611. doi:10.1371/journal.pone.0194611
42. Elshazly AM, Gewirtz DA. Is autophagy inhibition in combination with temozolomide a therapeutically viable strategy? *Cells.* 2023;12(4)doi:10.3390/cells12040535
43. Yang E, Wang L, Jin W, Liu X, Wang Q, Wu Y, et al. Pitr/cavin-1 enhances chemo-resistance and promotes temozolomide efflux through extracellular vesicles in glioblastoma. *Theranostics.* 2022;12(9):4330-4347. doi:10.7150/thno.71763
44. Thrasher PR, Scofield SLC, Dalal S, Crawford CC, Singh M, Singh K. Ataxia telangiectasia mutated kinase deficiency impairs the autophagic response early during myocardial infarction. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology.* 2018;315(1):H48-H57. doi:10.1152/ajpheart.00042.2018
45. Cheng A, Tse K-H, Chow H-M, Gan Y, Song X, Ma F, et al. Atm loss disrupts the autophagy-lysosomal pathway. *Autophagy.* 2021;17(8):1998-2010. doi:10.1080/15548627.2020.1805860
46. Fares J, Kashyap R, Zimmermann P. Syntenin: Key player in cancer exosome biogenesis and uptake? *Cell Adhesion & Migration.* 2017;11(2):124-126. doi:10.1080/19336918.2016.1225632
47. Lavin MF, Yeo AJ. Clinical potential of atm inhibitors. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis.* 2020;821:111695. doi:<https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2020.111695>
48. Burma S, Chen BP, Murphy M, Kurimasa A, Chen DJ. Atm phosphorylates histone h2ax in response to DNA double-strand breaks *. *Journal of Biological Chemistry.* 2001;276(45):42462-42467. doi:10.1074/jbc.C100466200
49. Veuger SJ, Durkacz BW. Persistence of unrepaired DNA double strand breaks caused by inhibition of atm does not lead to radio-sensitisation in the absence of nf-kb activation. *DNA Repair.* 2011;10(2):235-244. doi:<https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2010.11.005>
50. Rogakou EP, Nieves-Neira W, Boon C, Pommier Y, Bonner WM. Initiation of DNA fragmentation during apoptosis induces phosphorylation of h2ax histone at serine 139 *. *Journal of Biological Chemistry.* 2000;275(13):9390-9395. doi:10.1074/jbc.275.13.9390
51. Luczak MW, Zhitkovich A. Monoubiquitinated γ -h2ax: Abundant product and specific biomarker for non-apoptotic DNA double-strand breaks. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2018;355:238-246. doi:10.1016/j.taap.2018.07.007
52. Hewitt G, Carroll B, Sarallah R, Correia-Melo C, Ogrodnik M, Nelson G, et al. Sqstm1/p62 mediates crosstalk between autophagy and the ups in DNA repair. *Autophagy.* 2016;12(10):1917-1930. doi:10.1080/15548627.2016.1210368
53. Song P, Li S, Wu H, Gao R, Rao G, Wang D, et al. Parkin promotes proteasomal degradation of p62: Implication of selective vulnerability of neuronal cells in the pathogenesis of parkinson's disease. *Protein & Cell.* 2016;7(2):114-129. doi:10.1007/s13238-015-0230-9