

Д.А. Анискин, С.И. Якушов, С.В. Цибульников, К.Р. Канцерова
САРКОМА ЮИНГА: ВЫЯВЛЕНИЕ ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКИХ
МАРКЕРОВ, ОБУСЛАВЛИВАЮЩИХ УСТОЙЧИВОСТЬ
К ДОКСИРУБИЦИНУ

Научный руководитель: д-р биол. наук И.В. Уласов
Институт регенеративной медицины
Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России, г. Москва

D.A. Aniskin, S.I. Yakushov, S.V. Tsibulnikov, C.R. Cancerova
EWING'S SARCOMA: IDENTIFICATION OF CYTOPLASMIC MARKERS
LEADING TO RESISTANCE TO DOXYRUBICIN

Tutor: Dr. Sci. Biol. I.V. Ulasov
Institute for Regenerative Medicine
I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow

Резюме. Статистика выживаемости пациентов с саркомой Юинга неутешительна из-за высокой изменчивости её клеток, способствующей их выживанию и рецидивам. Данное исследование выявляет некоторые белки, опосредующие резистентность саркомы Юинга к доксорубину, свидетельствуя об индукции генов COL6A2 и MGST1 при терапии данным препаратом.

Ключевые слова: саркома Юинга, scRNAseq, протеомика, доксорубин, резистентность клеток.

Resume. The survival statistics of patients with Ewing's sarcoma are disappointing due to the high variability of its cells, contributing to their survival and relapses. This study reveals some proteins mediating the resistance of Ewing's sarcoma to doxorubicin, indicating the induction of the COL6A2 and MGST1 genes during therapy with this drug.

Keywords: ewing sarcoma; scRNAseq; proteomics; doxorubicin; cell resistances.

Актуальность. Саркома Юинга, крайне агрессивная злокачественная опухоль, обладающая метастатической активностью, занимает второе место в мире по распространённости среди детских сарком костей и составляет 2% от всех случаев детского рака. Выживаемость пациентов с локализованной формой - 60-70%, а пациентов с метастатической формой, наблюдающейся в 20-30% случаев при постановке диагноза, - от 20% до 45%, долгосрочная же выживаемость после рецидива составляет 20-30%.

Причина столь неутешительной статистики – высокая изменчивость клеток саркомы Юинга (ES), способствующая их выживанию и рецидивам. Несмотря на то, что в ходе многочисленных исследований EWSR1/FLI1 (EF) –основного онкодрайвера ES[5,6], было выявлено множество особых сигнальных путей, изучение которых дало более глубокий уровень понимания молекулярных механизмов ES, специфический транскрипционный контроль устойчивости этих опухолевых клеток к доксорубину, препарату, широко применяющемуся при химиотерапии, до сих пор остаётся не вполне ясным.

Понимание молекулярных механизмов, способствующих данной устойчивости, даст новые возможности при подборе терапевтических стратегий против саркомы Юинга.

Цель: цель данного исследования заключалась в установлении маркеров устойчивости и факторов резистентности клеток ES к доксирубицину, используя транскриптомный и протеомный анализы.

Задачи:

1. Анализ базы данных GO и выявление генов, ответственных за рецидивы или возникновение резистентности.
2. Выделе мРНК, подготовка библиотеки кДНК, анализ кластеров клеток single-cell RNAseq .
3. Анализ последовательностей РНК в клетках ES 36, полученных от пациента, и в эмбриональных фибробластах (M19).
4. Проведение протеомного анализа и анализ полученных данных.
5. Экспериментальная проверка значений при помощи полуколичественного анализа RT-PCR.

Материалы и методы. Данное исследование было одобрено комиссией по этике НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина. Были получены клеточные линии из опухолевой ткани, содержащей ES, подтверждена экспрессия химерного белка EWS-FLI1 с помощью ПЦР и секвенирования, а также проанализирована ДНК данных клеточных линий с помощью анализа коротких tandemных повторов (STR).

Были проведены: биоинформатический анализ РНК клинических баз данных (GO), включающих ES (данные были проанализированы веб-сервером для анализа функционального обогащения g:Profiler, пакет R «Cluster Profiler» использовался для объединения результатов анализа аннотации генов и экспрессии генов), транскриптомный анализ единичных клеток (РНК), протеомный анализ, полуколичественный анализ последовательностей РНК к смысловым генам, в ходе которого были использованы первичные ткани пациентов. Для этого была выделена тотальная мРНК и транскрибирована для полуколичественного определения генов MGST1 и COL6A2.

Статистическая обработка данных проводилась при помощи программы GraphPad Prism версии 8.3.0 и пакета stat версии 4.0.2 R.

Данное исследование проспонсировано грантом РФФ № 21-15-00213.

Результаты и их обсуждение. Для идентификации генов, стимулирующих прогрессию ES, были проанализированы базы данных GO, содержащих профили 46 пациентов с подтверждённым диагнозом ES и, благодаря регрессионному анализу Кокса, были выявлены 1006 генов с изменёнными экспрессиями: 812 генов с повышенной и 194 гена с пониженной.

На следующем этапе, благодаря единичной РНК-секвенции, был проведён анализ последовательностей РНК в клетках саркомы Юинга линии ES36 (полученных от пациентов), и, на основе полученных результатов, была создана библиотека кДНК. После фильтрации результатов был проведен биоинформатический анализ, в частности, пакетная обработка SEURAT (R) и были обнаружены уникальные кластеры генов в клетках ES36, которые отсутствовали в клетках фибробластов M19

(эмбриональные фибробласты человека). Кроме того, анализ кластеров C11 и C15 показал уникальное распределение генов с повышенной экспрессией (рис. 1А и 1Б): C11 в основном аккумулирует клетки с генами, ответственными за клеточную подвижность, клеточную адгезию и миграцию; в C15 большинство генов с повышенной экспрессией участвуют в передаче сигналов HIF1, а гены с подавленной экспрессией участвуют в клеточной адгезии.

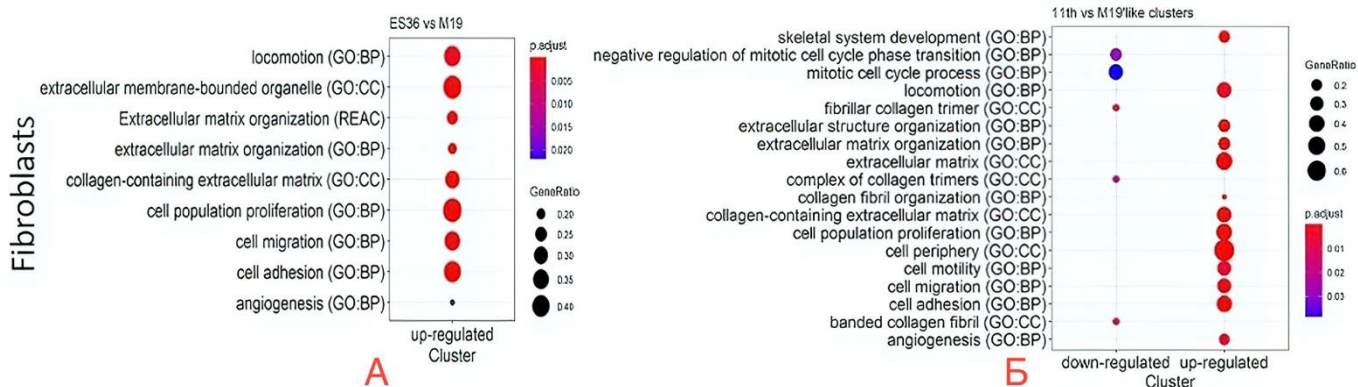


Рис. 1 – Результаты анализа терминов GO в кластерах C11 (А) и C15 (Б) опухолевых клеток ES36

Оказалось, что доксорубин вызывает экспрессию панели генов, уникальных для опухолевых клеток. В частности, были получены данные об экспрессии 11 потенциальных биомаркеров (белков, образуемых опухолевой клеткой в присутствии доксорубина). Среди них впервые была показана экспрессия белка COL6A2 в резистентных клетках ES, а также подтверждена роль MGST1, ранее идентифицированная в клетках ES коллегами из Италии[2].

Примечательно, что в случае сравнения ES36 DOX с ES36 MOCK мы обнаружили значительное снижение экспрессии всех трех альфа-спиралей белка COL6, включая COL6A2. Этот эффект означает более комплексное воздействие терапии доксорубицином на ES36, а именно изменение состава и трехмерной структуры внеклеточного коллагенового матрикса. В то же время экспрессия COL6A1 и COL6A2 также значительно снижена в ES36 DOX по сравнению с M19 DOX, что также указывает на специализированный и уникальный функциональный характер снижения уровня COL6 в клетках ES36 в ответ на DOX. Это может свидетельствовать об участии COL6 в формировании уязвимости к доксорубину, подобно клеткам рака молочной железы[3].

На последнем этапе мы провели полуколичественный анализ первичных опухолей на экспрессию генов MGST1 и COL6A2. Реакция обратной транскрипции (RT PCR) показала высокую экспрессию генов MGST1 и COL6A2 в первичных опухолевых тканях ES, в последующем сформировавших рецидив (согласно клинической информации).

Стоит отметить, что принято считать, что MGST1 обладает активностью гомодимеризации белка, что позволяет предположить, что ответ на стресс использует сигнал экспрессии MGST1 в качестве сигнала стрессора для повторного включения коллагеновых филаментов. Также вероятно, что COL6A2 выполняет функцию адаптационного мессенджера, чтобы унифицировать клеточный ответ во время

стресса DOX и нарушать клеточную адаптацию посредством кооперации с другими белками. Новые данные свидетельствуют о том, что гены, отвечающие за метаболизм глутатиона и ферменты, участвующие в данном обмене, находятся на переднем крае адаптивной клеточной реакции на стресс[4] во время DOX-опосредованной продукции активных форм кислорода. Учитывая, что DOX-резистентные клетки рака шейки матки также демонстрируют активацию передачи сигналов GSH, включая изоформы экспрессии гена MGST1[1], активация таких белков может представлять собой DOX-специфическую стрессовую сеть, которая развивает клеточную функцию во время стресса и становится общей чертой для различных опухолей. клетки. Взаимодействие между различными клеточными функциями, опосредованными COL6A2 и MGST1, координирует уязвимость опухолевых клеток и может определять тяжесть повреждения ES-клеток.

Выводы:

1. Транскрипционные профили опухолевых клеток (ES36) сильно отличаются от соответствующих профилей эмбриональных фибробластов (M19).
2. Результаты данного исследования свидетельствуют об индукции генов COL6A2 и MGST1 при терапии доxorубицином. В частности, экспрессия COL6A2 приводит к ремоделированию коллагена, ранее показанного на фибробластах человека.

Поскольку одним из препаратов, применяемым при химиотерапии, является доxorубин и на него формируется резистентность у опухоли, наша задача была выявить влияние генов резистентности на уровне белков. ES36 искусственно сделали резистентной, то же сделали M19. Тоже доxorубин, одна и та же доза, чтобы вызвать индукцию белков, уникальных для ES36 и белков, которые и для ES36 и M19 имеют общее происхождение

Литература

1. Drozd E. [и др.]. Up-regulation of glutathione-related genes, enzyme activities and transport proteins in human cervical cancer cells treated with doxorubicin // *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*. 2016. (83). С. 397–406.
2. Levick S. P. [и др.]. Doxorubicin-Induced Myocardial Fibrosis Involves the Neurokinin-1 Receptor and Direct Effects on Cardiac Fibroblasts // *Heart, Lung & Circulation*. 2019. № 10 (28). С. 1598–1605.
3. Lovitt C. J., Shelper T. B., Avery V. M. Doxorubicin resistance in breast cancer cells is mediated by extracellular matrix proteins // *BMC cancer*. 2018. № 1 (18). С. 41.
4. McIlwain C. C., Townsend D. M., Tew K. D. Glutathione S-transferase polymorphisms: cancer incidence and therapy // *Oncogene*. 2006. № 11 (25). С. 1639–1648.
5. Riggi N., Stamenkovic I. The Biology of Ewing sarcoma // *Cancer Letters*. 2007. № 1 (254). С. 1–10.
6. Trancău I. Chromosomal translocations highlighted in Primitive Neuroectodermal Tumors (PNET) and Ewing sarcoma // *Journal of Medicine and Life*. 2014. № Spec Iss 3 (7). С. 44–50.