

МЕХАНИЗМЫ ЭПИГЕНЕТИЧЕСКОЙ РЕГУЛЯЦИИ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ КЛЕТОК МЕЛАНОМЫ

Зинченко И.С., Рукша Т.Г.

Красноярский государственный медицинский университет им. профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого Министерства здравоохранения РФ, Красноярск, e-mail: tatyana_ruksha@mail.ru

Исследование проведено с использованием дакарбазина, воздействие которого на клетки меланомы BRO привело к изменениям в экспрессии более чем 8000 мРНК и 36 микроРНК. В частности, экспрессия микроРНК hsa-miR21-5p и hsa-miR-146a-5p была снижена, а hsa-miR-320a и hsa-miR-6871-5p повышена. Полнотранскриптомный анализ мРНК также выявил статистически значимые изменения в экспрессии 8279 мРНК генов, из которых 3519 молекул имели повышенную экспрессию, а 4760 снизили экспрессию после воздействия дакарбазином. На основе метода анализа обогащения (ORA) определено, что гены-мишени hsa-miR21-5p и hsa-miR-146a-5p участвуют в механизмах передачи сигнала, связанных с лекарственной устойчивостью и ходом клеточного цикла. Гены-мишени микроРНК с повышенной экспрессией после воздействия дакарбазином – hsa-miR-320a и hsa-miR-6871-5p участвуют в механизмах внутриклеточной сигнализации, связанной с приобретением признаков клеточного старения и выхода и из клеточного цикла, изменением контактов с внеклеточным матриксом. Выявленные изменения отражают процессы транскриптомного перепрограммирования клеток меланомы после воздействия дакарбазином, что выражается в переходе в обратимое непролиферирующее состояние, позволяющее клетке сохранять жизнеспособность с последующим возвращением в клеточный цикл.

Ключевые слова: hsa-miR21-5p, hsa-miR-146a-5p меланома, микроРНК, микрочипирование, клеточный цикл, дакарбазин, лекарственная устойчивость.

Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (№ 19-15-00110, <https://rscf.ru/project/19-15-00110/>).

EPIGENETIC MECHANISMS OF MELANOMA CELLS DRUG RESISTANCE REGULATION

Zinchenko I.S., Ruksha T.G.

Krasnoyarsk State Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation, Krasnoyarsk, e-mail: tatyana_ruksha@mail.ru

The study was performed on melanoma cells subjected to chemotherapeutic agent Dacarbazine treatment. Eight thousand mRNAs and 36 microRNAs were altered in melanoma cells BRO under Dacarbazine treatment. Hsa-miR21-5p and hsa-miR-146a-5p were down-regulated whereas hsa-miR-320a and hsa-miR-6871-5p were up-regulated. Full transcriptome analysis of mRNA revealed altered expression of 8,279 genes, of which 3,519 genes had increased expression, and 4,760 genes decreased expression after exposure to dacarbazine. Additionally, the enrichment analysis (ORA) method was used. The application of ORA revealed that target genes of hsa-miR21-5p and hsa-miR-146a-5p were implicated in cancer cell drug resistance development and cell cycle machinery regulation. Target genes of hsa-miR-320a and hsa-miR-6871 were involved in processes of cell senescence, exit from a cell cycle and intercellular matrix interaction. Obtained data demonstrates phenotypic reprogramming of melanoma cells under Dacarbazine treatment that is associated with transition into non-proliferative state allowing to survive and re-entry to cell cycle later.

Keywords: hsa-miR21-5p, hsa-miR-146a-5p, melanoma, microRNA, microarray, cell cycle, dacarbazine, chemoresistance.

The study was supported by the Russian Science Foundation (No. 19-15-00110, <https://rscf.ru/project/19-15-00110/>).

Меланома кожи в начале XXXI века остается серьезным злокачественным новообразованием, представляющим угрозу для жизни. Заболеваемость меланомой

продолжает расти среди лиц со светлым типом кожи. Меланома слизистых характерна для лиц с более темным типом кожи. Эта разновидность опухоли встречается реже, но бывает более агрессивной в течении.

Меланома кожи поддается успешному лечению на ранних стадиях при помощи хирургических вмешательств. Однако при диссеминированных формах опухоли варианты лечения становятся ограниченными, и показатели выживаемость снижаются в значительной степени. Меланома кожи, как и другие злокачественные опухоли, формируется в результате развивающихся в клетках генетических и эпигенетических изменений, которые до сих пор недостаточно изучены [1]. Одними из характерных эпигенетических регуляторов канцерогенеза являются микроРНК [2].

МикроРНК – это некодирующие РНК, которые контролируют экспрессию генов, взаимодействуя с целевой мРНК и либо вызывая ее распад, либо ингибируя процесс трансляции. Процесс синтеза микроРНК начинается в ядре клетки, где образуется первичный транскрипт, известный как прай-микроРНК. Затем под действием нуклеазы-РНКазы III типа образуются молекулы микроРНК размером примерно 60–70 нуклеотидов. Эти молекулы связываются с экспортином и перемещаются в цитоплазму. Фермент Dicer формирует асимметричный дуплекс микроРНК, который взаимодействует с РНК-индуцированным комплексом сдвига (комплексом RISC), в результате образуется зрелая, функционально активная микроРНК [3]. МикроРНК регулируют многочисленные процессы канцерогенеза, но их функционирование также связывают с развитием лекарственной устойчивости опухолей – процессы уклонения от апоптоз-индуцирующих стимулов, фенотипического перепрограммирования, модификации молекулярных мишеней и репарации ДНК опухолевых клеток находятся под регуляторным воздействием микроРНК [4].

Дакарбазин является химиотерапевтическим препаратом, эффекты которого связаны с повреждением ДНК посредством ее алкилирования с последующей индукцией апоптоза. Эффективность дакарбазина низкая, но вместе с тем он остается референсным средством для создания новых способов лекарственной терапии при меланоме.

Целью данного исследования являлось соотнесение транскриптомного профиля и профиля микроРНК клеток меланомы, сохранявших жизнеспособность после воздействия дакарбазином, для определения новых маркеров и механизмов развития лекарственной устойчивости.

Материал и методы исследования

Культивирование клеток меланомы

Клеточную линию меланомы кожи человека BRO культивировали в среде DMEM (ООО НПП «ПанЭко», Москва, Россия) с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки

(FBS) (HyClone, GmbH, Паршинг, Австрия) и 1% раствора антибиотик/антимикотик (Gibco Life Technologies, Гранд-Айланд, Нидерланды) в инкубаторе (Sanyo Electric Co. Ltd., Япония) при 37°C и 5% CO₂. При достижении монослоя с конfluenceностью 80% клетки подвергались дезагрегации методом трипсинизации и рассева для дальнейших экспериментов. В питательную среду без добавления антибиотика вносили дакарбазин в концентрации 1.2 мМ и культивировали в CO₂ инкубаторе в течение 72 ч при 37°C. В качестве контроля использовали клетки с добавлением растворителя дакарбазина – диметилсульфоксид (ДМСО) (Helicon, Москва, Россия). Через 72 часа клетки промывали фосфатно-солевым раствором (PBS) (Helicon, Москва, Россия), помещали в свежую среду без цитостатика и инкубировали еще 48 часов. По завершении инкубации клетки повторно промывали PBS и приступали к дальнейшим экспериментам.

Микрочипирование микроРНК

В исследовании микроРНК использовалась система GeneAtlas Microarray System (Affymetrix, Inc, США). Образцы РНК подвергали мечению с помощью Flash TagTM Biotin HSR Labeling kit (Thermo Fisher Scientific, USA). Концентрацию и чистоту образцов проверяли с помощью прибора Qubit® 2.0. (Invitrogen, USA). Для анализа использовали 100 нг общей РНК. Гибридизацию производили на чипе Affymetrix miRNA 4.1 Array Strip при 48°C в течение 20 часов. Результаты обрабатывали с помощью программы Transcriptome Analysis Console v. 4.0.3. (Affymetrix, USA). Дифференциально-экспрессируемые микроРНК отбирали на основе статистической значимости ($p < 0,05$) и кратности различий (2 и более), используя коэффициент ложного обнаружения FDR. Контроль качества проводили на каждом этапе с использованием GeneAtlas Transcriptome Analysis Console (ТАС) и комплекса реагентов Hybridization Control Kit (Thermo Fisher Scientific, USA).

Микрочипирование мРНК

Для анализа транскриптома клеток меланомы ВRO образцы тотальной РНК нормализовали до концентрации 250 нг/мкл. Затем синтезировали кДНК в два этапа, амплифицировали кРНК, осуществляли ее очистку с использованием магнитных частиц, и на ее основе синтезировали в целевую ДНК, фрагментировали целевую ДНК и подвергали мечению. Гибридизация выполнялась на микрочипе, детектировался в последующем флуоресцентный сигнал и производился анализ дифференциально-экспрессируемых транскриптов на основе статистической значимости ($p < 0,05$), коэффициента ложного обнаружения FDR и кратности различий (2 и более).

Биоинформатический анализ

Анализ сигнальных путей, которые регулируются измененными микроРНК, был проведен с использованием интернет-ресурса DIANA-mirPath v.3.0, который основывается на Киотской энциклопедии генов и геномов [5]. Уровень значимости составлял $p < 0.05$.

Для анализа дифференциально экспрессирующихся генов-мишеней с точки зрения их биологической значимости и для выявления наиболее значимых сигнальных путей, в которых они участвуют, был использован метод анализа обогащения (ORA).

Статистический анализ

Программа Transcriptome Analysis Console (TAC) v. 4.0.1 использовалась для обработки данных, выполнения статистического анализа и визуализации результатов. Этот инструмент предоставил нам необходимые средства для расчета поправки на множественную проверку гипотез по методу Беньямини–Хохберга. Для подтверждения надежности результатов мы провели контроль качества, который включал в исследование только те гены, у которых значение $FDR < 0.05$.

Результаты исследования и их обсуждение

В клетках, сохранявших жизнеспособность после воздействия дакарбазином, было определено изменение уровня более чем 8000 мРНК, 36 микроРНК. При анализе профиля экспрессии микроРНК в клеточной линии меланомы BRO после воздействия дакарбазином обнаружено статистически значимое ($p < 0,05$) снижение экспрессии микроРНК hsa-miR21-5p и hsa-miR-146a-5p в 7 и 6,93 раза соответственно относительно контрольной группы. При этом обнаружено статистически значимое повышение ($p < 0,05$) экспрессии микроРНК hsa-miR-320a и hsa-miR-6871-5p в 2,77 и 2,73 раза соответственно относительно контрольной группы.

Проведенный в ходе исследования полнотранскриптомный мРНК анализ клеток меланомы BRO до и после воздействия дакарбазином определил статистически значимые изменения экспрессии 8279 генов ($p < 0,05$). У 3519 генов повысилась экспрессия после воздействия дакарбазином по сравнению с контрольной группой, у 4760 генов снизилась экспрессия после воздействия дакарбазином. Результаты транскриптомного профилирования клеток меланомы после воздействия дакарбазином были загружены в базу данных ArrayExpress Archive E-MTAB-11399 (<https://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/experiments/E-MTAB-11399>).

Таким образом, hsa-miR-21-5p являлась микроРНК с наиболее дифференциально сниженной экспрессией после воздействия с дакарбазином была. Известно, что изменения уровня данной микроРНК наблюдаются при многих типах злокачественных новообразований. В ряде исследований hsa-miR-21-5p рассматривается как своеобразный регуляторный «хаб» в опухолевых клетках. Действительно, согласно транскриптомному исследованию мРНК определили, что 278 генов, являющихся мишенью hsa-miR-21-5p, показали изменение

экспрессии в клетках меланомы после воздействия дакарбазином более чем в 2 раза. При этом у 246 наблюдалось повышение экспрессии, у 32 – снижение (рис. 1).

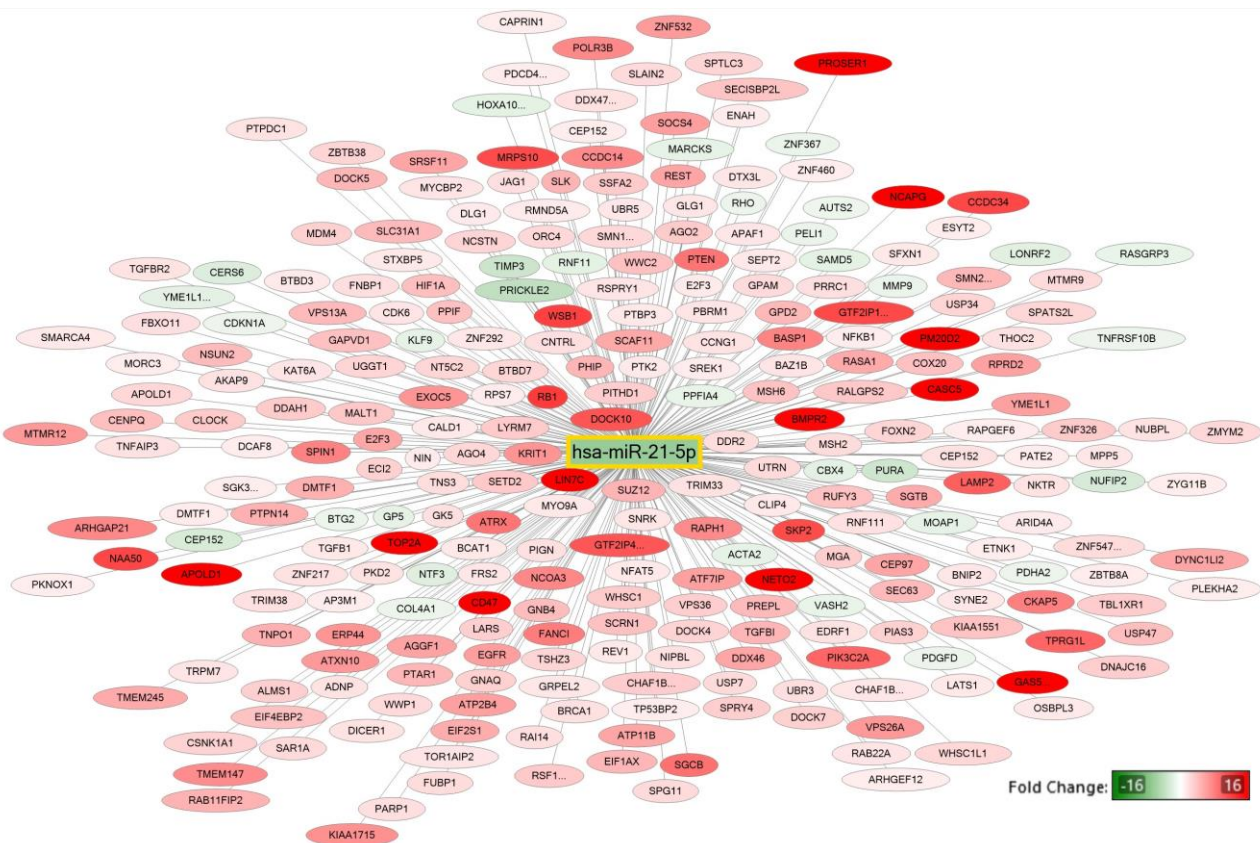


Рис. 1. Гены-мишени *hsa-miR-21-5p*, измененные более чем в 2 раза по результатам полнотранскриптомного анализа мРНК. В квадрате обозначена микроРНК с измененным уровнем экспрессии ($p < 0,05$), а в овалах представлены ее гены-мишени: красным цветом показаны с повышенной экспрессией, зеленым – с пониженной

Биоинформатический анализ сигнальных путей (KEEG) 278 генов-мишеней микроРНК *hsa-miR-21-5p* с измененной экспрессией после воздействия дакарбазином выявил как один из наиболее обогащенных измененными транскриптами сигнальных путей сигнальный каскад формирования лекарственной устойчивости к препаратам платины. Устойчивость реализуется путем нарушения процессов репарации ошибочно спаренных нуклеотидов, тем самым повышается толерантность к химиотерапевтическому препарату платины. Также повышается активность механизмов эксцизионной репарации нуклеотидов, тем самым нивелируется повреждающее действие химиотерапевтических препаратов. Вероятно, что аналогичные процессы происходят при воздействии на опухолевые клетки алкилирующего агента дакарбазина [6].

Согласно проведенному биоинформатическому анализу, гены-мишени микроРНК *hsa-miR-21-5p* с измененной экспрессией являются внутриклеточного сигнального каскада,

регулирующего клеточный цикл в фазах G1 и S. Компонентами данного механизма внутриклеточной сигнализации являются дифференциально измененные мРНК генов *ATRX*, *NIPBL*, *TGFB*, *SKP2*, *RB*, *CDK4* и *ORK4*, участвующие в реализации процессов хода клеточного цикла, процессов клеточного старения [7].

На рисунке 1 показаны результаты выполненного анализа с применением метода анализа обогащения (ORA), демонстрирующие высокую регуляторную активность *hsa-miR-21-5p* в клетках меланомы. Стоит обратить внимание, что большинство генов-мишеней этой микроРНК характеризовались повышением экспрессии, а та меньшая часть, у которой снижалась экспрессия, демонстрировала относительно невысокие уровни изменений. Таким образом, стоит предположить, что *hsa-miR-21-5p* активно регулирует процессы, связанные с лекарственной устойчивостью опухолевых клеток.

Помимо *hsa-miR-21-5p* к микроРНК с наиболее измененным уровнем после воздействия на клетки меланомы дакарбазина относится *hsa-miR-146a-5p*. Анализ полнотранскриптомных данных мРНК также показал статистически значимую дисрегуляцию 81 гена-мишени *hsa-miR-146a-5p*. Из них 63 гена показали увеличение экспрессии, в то время как у 17 генов наблюдалось снижение уровня экспрессии (рис. 2).

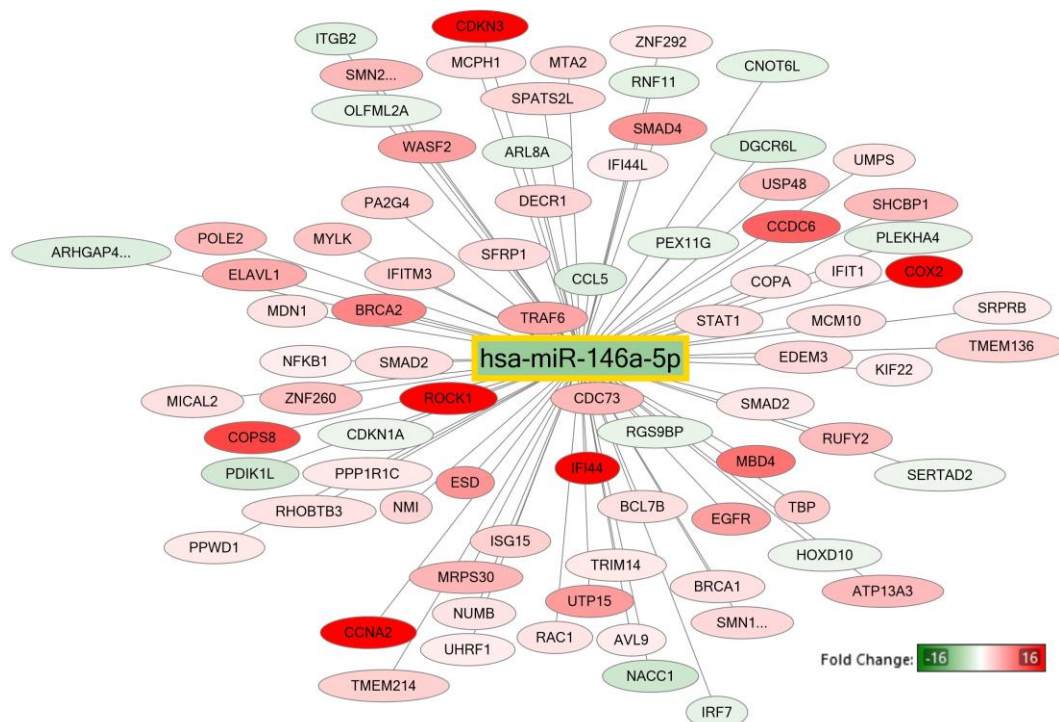


Рис. 2. Гены-мишени *hsa-miR-146a-5p*, измененные более чем в 2 раза по результатам полнотранскриптомного анализа мРНК. В квадрате обозначена микроРНК с измененным уровнем экспрессии ($p < 0,05$), а в овалах представлены ее гены-мишени: красным цветом показаны с повышенной экспрессией, зеленым – с пониженной

Биоинформатический анализ сигнальных путей (KEEG) вышеуказанных 81 гена показал, что генами-мишенями hsa-miR-146a-5p являются ингибитор циклинзависимой киназы 1A (*CDKN1A*), транскрипционные факторы-опухолевые супрессоры *SMAD2*, *SMAD4*, циклин A2 (*CCNA2*), участвующие также в регуляции клеточного цикла в S, G2 и M-фазах [8, 9, 10]. Данные изменения могут свидетельствовать о нарушениях динамики клеточного цикла, происходящих в клетках меланомы под воздействием дакарбазина. Это согласуется с известными данными о механизмах действия алкилирующих агентов – противоопухолевых препаратов. Вместе с тем, если ранее предполагалось, что остановка клеточного цикла неизбежно связана с необратимым процессом клеточного старения и последующим развитием апоптоза, то сейчас становится очевидным, что клеточное старение может быть обратимым, а значит, опухолевые клетки с поврежденным геномом могут далее пролиферировать, обеспечивая еще большую гетерогенность опухоли и ее прогрессию в последующем.

Интересно, что 9 генов-мишеней hsa-miR-21-5p и hsa-miR-146a-5p были общими, что может иметь важное значение для понимания биологических изменений, связанных с этими молекулами микроРНК. В число измененных генов входят столь важный регулятор процессов репарации ДНК *BRCA1*, а также вышеупомянутый *CDKN1A*, участвующий в формировании фенотипа клеточного старения, ген *NFKB1*, кодирующий многофункциональный одноименный белок – транскрипционный фактор, опосредующий процессы воспаления, апоптоза, пролиферации гена. Таким образом, супрессия микроРНК hsa-miR-21-5p и hsa-miR-146a-5p вызывает повышение уровня генов, участвующих в процессах репарации ДНК опухолевых клеток и переключении их фенотипа, позволяющем сохранять жизнеспособность в условиях действия неблагоприятных факторов.

К числу микроРНК, уровни которых были повышены в клетках меланомы после воздействия дакарбазином, относятся hsa-miR-320a и hsa-miR-6871-5p. Генами-мишенями hsa-miR-320a с пониженной экспрессией были гены, кодирующие белки цитоскелета *TUBA1A*, *TUBA1B*, *ACTG1*, а также гены, кодирующие белки, участвующие в осуществлении контактов с внеклеточным матриксом (*LMNB1*) и реализации апоптоза (*MCL1*), что вместе свидетельствует об изменении характера взаимодействия с внеклеточным матриксом (рис. 3). Последнее может быть связано с процессами сохранения жизнеспособности опухолевых клеток и избеганием апоптоза в метастатических нишах, а также с процессом метастазирования. По результатам полнотранскриптомного исследования мРНК наблюдалась дисрегуляция 32 генов-мишеней hsa-miR-6871-5p. Экспрессия 24 генов снизилась, 8 – повысилась более чем в 2 раза (рис. 4). hsa-miR-6871-5p посредством регуляции генов *E2F3*, *MCM7* и *BUB1*, возможно, влияет на G1, S и G2 фазы клеточного цикла, супрессируя ход клеточного цикла.

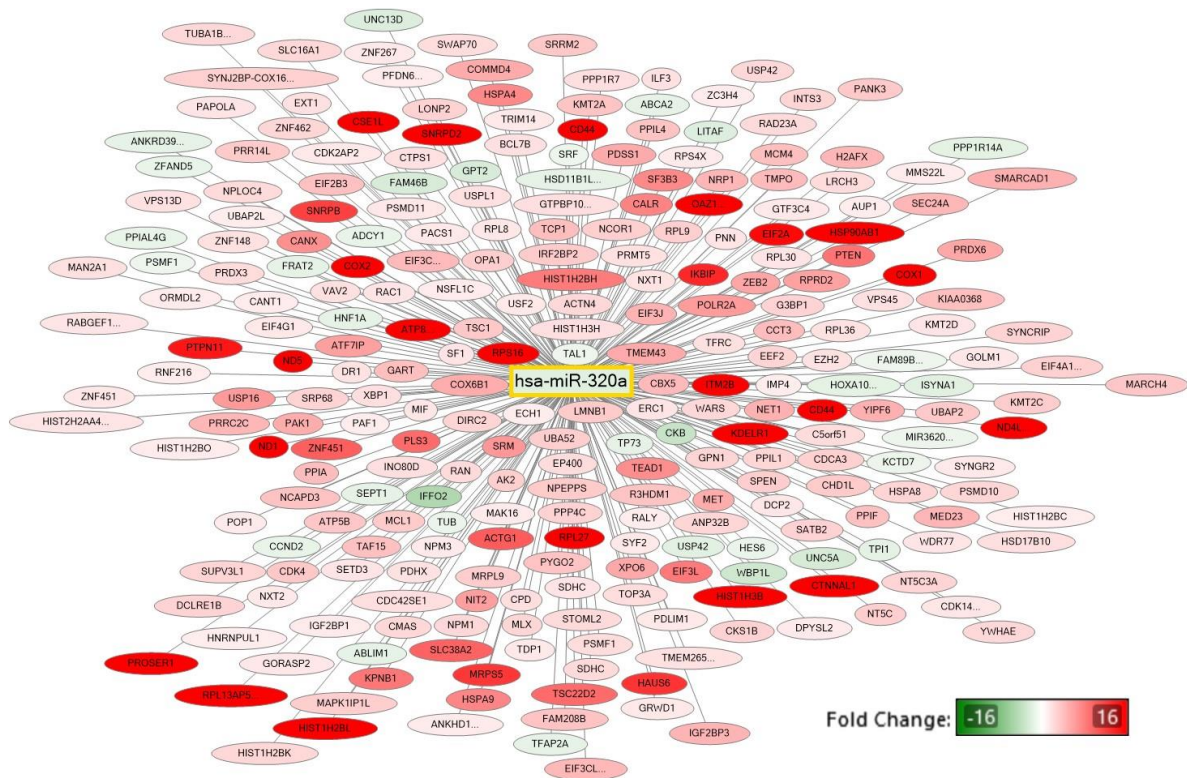


Рис. 3. Гены-мишени *hsa-miR-320a*, измененные более чем в 2 раза по результатам полнотранскриптомного анализа мРНК. В квадрате обозначена микроРНК с измененным уровнем экспрессии ($p < 0,05$), а в овалах представлены ее гены-мишени: красным цветом показаны с повышенной экспрессией, зеленым – с пониженной

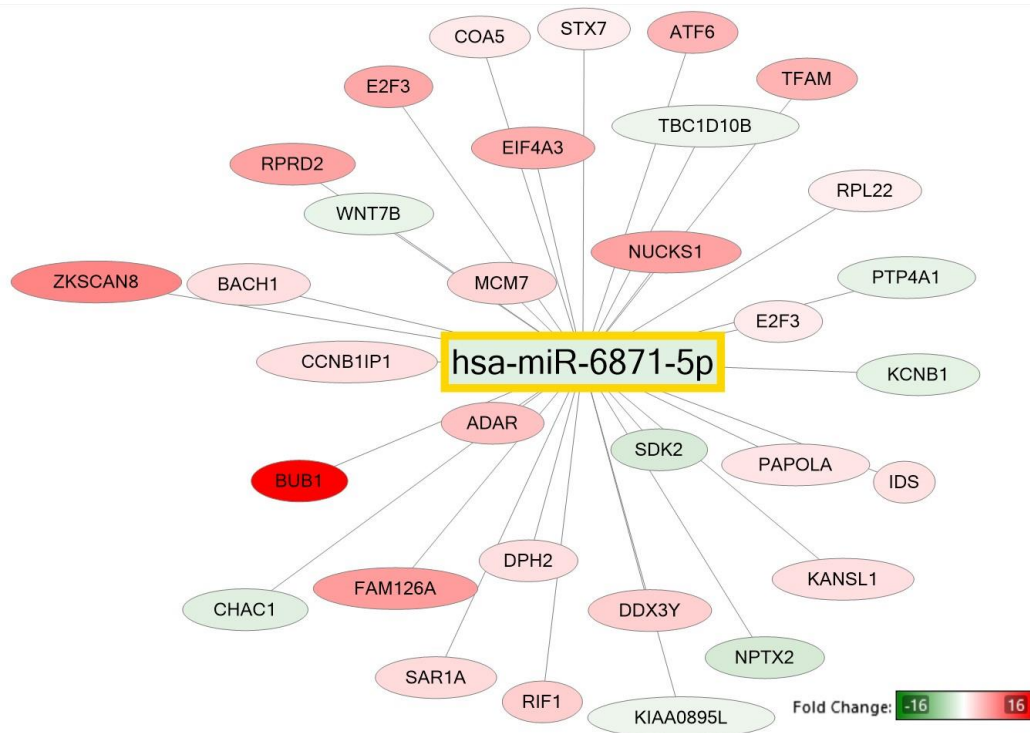


Рис. 4. Гены-мишени *hsa-miR-6871-5p*, измененные более чем в 2 раза по результатам полнотранскриптомного анализа мРНК. В квадрате обозначена микроРНК с измененным

уровнем экспрессии ($p < 0,05$), а в овалах представлены ее гены-мишени: красным цветом показаны с повышенной экспрессией, зеленым – с пониженной

Выводы

Исследование, проведенное на клетках меланомы BRO после воздействия дакарбазином, выявило значительные изменения в экспрессии генов и микроРНК. Эти результаты показывают вовлеченность микроРНК в процессы перепрограммирования транскриптома, возникающего в опухолевых клетках в ответ на действие повреждающего фактора – противоопухолевого агента дакарбазин.

По результатам исследования профиля экспрессии микроРНК было показано статистически значимое снижение экспрессии hsa-miR21-5p и hsa-miR-146a-5p, а также статистически значимое повышение экспрессии hsa-miR-320a и hsa-miR-6871-5p после инкубации клеток с дакарбазином. Эти результаты указывают на потенциальную важность этих микроРНК в механизмах ответа на лечение дакарбазином.

Дальнейший биоинформатический анализ транскриптома клеток и профилирования микроРНК показал наибольшие изменения в процессах регуляции репарации ДНК, избегания апоптоза, а также хода клеточного цикла. Клетки меланомы при воздействии дакарбазина демонстрируют фенотипическую пластичность, выражающуюся в переходе в непролиферирующее состояние и позволяющую сохранять жизнеспособность.

Список литературы

1. Tian Y., Ma J., Wang H., Yi X., Wang H., Zhang H., Guo S., Yang Y., Zhang B., Du J., Shi Q., Gao T., Guo W., Li C. BCAT2 promotes melanoma progression by activating lipogenesis via the epigenetic regulation of FASN and ACLY expressions // Cell Mol Life Sci. 2023. Vol. 80 P. 315. DOI: 10.1007/s00018-023-04965-8.
2. Powers J.T., Tsanov K.M., Pearson D.S., Roels F., Spina C.S., Ebright R., Seligson M., de Soysa Y., Cahan P., Theißen J., Tu H.C., Han A., Kurek K.C., LaPier G.S., Osborne J.K. Multiple mechanisms disrupt the let-7 microRNA family in neuroblastoma // Nature. 2016. Vol. 535. P. 246–251. DOI: 10.1038/nature18632.
3. Ho P.T.B., Clark I.M., Le L.T.T. MicroRNA-Based Diagnosis and Therapy // Int. J. Mol Sci. 2022. Vol. 23 P. 7167. DOI: 10.3390/ijms23137167.
4. Milanovic M., Fan D.N.Y., Belenki D., Dabritz J.H.M. et al. Senescence-associated reprogramming promotes cancer stemness // Nature. 2018. Vol. 553 P. 96–100. DOI: 10.1038/nature25167.

5. Silva J.D., Nogueira L., Coelho R., Deus A., Khayat A., Marchi R., Oliveira E., Santos A.P.D., Cavalli L., Pereira S. HPV-associated penile cancer: Impact of copy number alterations in miRNA/mRNA interactions and potential druggable targets // *Cancer Biomark*. 2021. Vol. 32 (2). P. 147–160. DOI: 10.3233/CBM-210035.
6. Despotovic J., Dragicevic S., Nikolic A. Effects of Chemotherapy for Metastatic Colorectal Cancer on the TGF- β Signaling and Related miRNAs hsa-miR-17-5p, hsa-miR-21-5p and hsa-miR-93-5p // *Cell Biochem Biophys*. 2021. Vol. 79 P. 757–767. DOI: 10.1007/s12013-021-00980-3.
7. Sanchez-Diaz P.C., Hsiao T.H., Chang J.C., Yue D., Tan M.C., Chen H.I., Tomlinson G.E., Huang Y., Chen Y., Hung J.Y. De-regulated microRNAs in pediatric cancer stem cells target pathways involved in cell proliferation, cell cycle and development // *PLoS One*. 2013 Vol. 8. DOI: 10.1371/journal.pone.0061622.
8. Engeland K. Cell cycle regulation: p53-p21-RB signaling // *Cell Death Differ*. 2022. Vol. 29 P. 946–960. DOI: 10.1038/s41418-022-00988-z.
9. Zhang B., Leng C., Wu C., Zhang Z., Dou L., Luo X., Zhang B., Chen X. Smad4 sensitizes colorectal cancer to 5-fluorouracil through cell cycle arrest by inhibiting the PI3K/Akt/CDC2/survivin cascade // *Oncol Rep*. 2016. Vol. 35 P. 1807–1815. DOI: 10.3892/or.2015.4479.
10. Bertero A., Brown S., Madrigal P., Osnato A., Ortmann D., Yiangou ., Kadiwala J., Hubner N.C., de Los Mozos I.R., Sadée C., Lenaerts A.S., Nakanoh S., Grandy R., Farnell E., Ule J., Stunnenberg H.G., Mendjan S., Vallier L. The SMAD2/3 interactome reveals that TGF β controls m6A mRNA methylation in pluripotency // *Nature*. 2018. Vol. 555. P. 256-259. DOI: 10.1038/nature25784.