

УДК: 618.19-006.55:576.3

<https://doi.org/10.21603/-I-IC-39>

МЕХАНИЗМЫ ДЕДИФФЕРЕНЦИРОВКИ НЕСТВОЛОВЫХ КЛЕТОК РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ДО СТВОЛОВЫХ

Д.С. Долгашева, Е.А. Здерева, И.А. Цыденова, К.А. Гаптулбарова, М.К. Ибрагимова, Н.В. Литвяков

Научно-исследовательский институт онкологии Томского национального
исследовательского медицинского центра РАН, г. Томск, Россия

Аннотация

Известно, что способность к дедифференцировке у нестволовых клеток опухоли определяет ее злокачественность и ее способность к метастазированию [1]. Отсутствием способности к дедифференцировке и индукции полноценного стволового фенотипа объясняется неспособность опухолей в пределах одной локализации к метастазированию. Ранее мы показали, что приобретение способности к дедифференцировке является маркером готовности опухоли к метастазированию. Этот процесс происходит при эктопической экспрессии генов стволовости за счет амплификаций их локусов в разных хромосомах опухолевых клеток. На клиническом материале было показано, что наличие двух и более амплификаций разных хромосом в остаточной опухоли ассоциировано с высокой частотой метастазирования [2]. Таким образом, целью настоящей работы явилось изучение механизмов регуляции дедифференцировки опухолевых нестволовых клеток в опухолевые стволовые на моделях *in vitro*.

Ключевые слова: рак молочной железы, дедифференцировка, метастазирование, стволовые опухолевые клетки, маммосферы, гены стволовости, ингибиторы генов

Материалы и методы. Стабильные клеточные линии рака молочной железы (BT-549, MDA-MB-231, MCF-7, SK-BR-3 и T47D) культивировали в подходящих питательных средах в стандартных условиях. CNA-генетический ландшафт и транскриптом клеток исследовали на микрочипах CytoScan HD Array и Clariom S Assay соответственно. Субпопуляционный состав клеточных линий изучали на проточном цитометре. Отбор клеток, отрицательных по CD44 проводился на приборе Sony SH800. В работе использовали ингибиторы генов *TERT* (BIBR1532), *MYC* (10058-F4) и *NOTCH1* (FLI-06).

Результаты. Было установлено, что все клеточные линии, кроме BT-549, несут две и более ампликации генов стволовости. Основную массу MCF-7 составляет субпопуляция прогениторных опухолевых клеток (ПОК – CD44+CD24+), дифференцированные опухолевые клетки (ДОК CD44-CD24-/+) составляют около 13%. Линии SK-BR-3 и BT-549 содержат в основном ДОК 2-го порядка (CD44-CD24-). У линии T47D, общее количество ДОК 1 и 2 поколения составляет 29%. Показано, что клетки MCF-7 дикого типа спонтанно образуют маммосферы без индукции IL6 уже на 14 сутки роста, но в присутствии IL6 на 14 и 21 сутки наблюдается большее количество крупных маммосфер. Дифференцированные опухолевые клетки MCF-7 без IL6 образуют мелкие сфероиды лишь на 21 день. В присутствии IL6 маммосферы наблюдаются на 14 сутки. Сравнение экспрессии генов стволовости на 3 и 21 сутки роста показало, что первоначально, в группе ДОК+IL6 линии MCF7, снижается в 2 и более раза экспрессия *VIM*, который является маркером эпителиально-мезенхимального перехода (EMT), а также *TERT* и *LNMB2*, и повышается экспрессия *KLF4*. На этапе маммосферообразования (21 сутки) в группе ДОК+IL6, усиливается экспрессия *LMNB2*, *SOX4*, *FZD1*, *MYC*, *BM11*, *KLF5*, *SMAD9*, *SMAD4*, *SMAD2*, *HIF3A* и снижается активность *DPPA4*, *SNAI2*, *SOX1*,

FLT3. Экспрессия гена *MYC* активируется при маммосферообразовании во вторую фазу на 21 сутки. Действие ИЛ6 на клетки дикого типа и дифференцированные опухолевые клетки различно. У дикого типа на 3-е сутки ИЛ6 активирует экспрессию *SOX2*, *TERT* и ингибирует *PIM1*. *SOX2* запускает деление ОСК, что приводит к формированию маммосфер. В ДОК на 3 сутки ИЛ6 снижает экспрессию *LMNB2*, *VIM* и *SMAD9*. На 21 сутки ИЛ6 в клетках дикого типа активирует экспрессию *DPPA4*, *SOX1*, *SMO*, *MOB3B*, *LAT* и ингибирует активность *KLF5*, *KLF4*, *MYC*, *LNMB2*, *SMAD2*, *SMAD4*, *BMII*. В ДОК под действием ИЛ6 на 21 сутки активируется экспрессия *SMAD9*, *SMAD2*, *KLF6*, *BMII*, *MYC* и при этом подавляется экспрессия *FLT3*, *DPPA4*, *SNAI2*. Эксперимент с T47D показал, что в группе ДОК сфероиды образуются без ИЛ6 уже на 3 сутки эксперимента, а на 7 сутки наблюдаются полноценные маммосферы. Показано, что на 21 сутки количество маммосфер в группе с ДОК меньше, чем в контроле, при этом клеточная масса в контроле ДОК больше. Ингибиторы BIBR1532 и 10058-F4 блокируют дедифференцировку ДОК T47D до ОСК по пути CD44-CD24- CD44+CD24-. BIBR1532 и 10058-F4 блокируют активность ОСК в клетках дикого типа. Ингибитор FLI-06 снижает дедифференцировку ДОК до ОСК по пути CD44-CD24- CD44+CD24-, а также подавляет активность ОСК в культурах дикого типа и блокирует пролиферацию и дедифференцировку ДОК до прогениторных опухолевых клеток по пути по пути CD44-CD24+ CD44+CD24+. Было показано, что комплекс ингибиторов в ДОК T47D подавляет дедифференцировку до ОСК и ПОК. Ингибитор BIBR1532 подавляет экспрессию 11 генов стволовости (*MYC*, *FZD9*, *NANOG*, *SMAD2*, *SMAD4*, *FZD1*, *SMO*, *MOB3B*, *ITGB1*, *BMII*, *TGFBR1*), из них два амплифицированы у T47D (*MYC* и *FZD9*), и активирует экспрессию *KLF6* и *LAT*. Ингибитор 10058-F4 подавляет экспрессию пяти генов стволовости *MYC*, *NANOG*, *FZD9*, *MOB3B*, *TGFBR1*, *PIM1* и повышает активность 11 генов (*SOX2*, *KLF4*, *KLF6*, *KLF1*, *SMAD2*, *SMAD9*, *LIFR*, *LNMB2*, *ZEB1*, *BMP6*, *HIF3A*). FLI-06 снижает в 2 и более раза экспрессию *VIM*, *DPPA4* и *FZD9* и не препятствует дедифференцировке ДОК. Все три ингибитора подавляют, более чем в 2 раза, экспрессию *NANOG*, *LNMB2*, *LIFR*, *MYC*, *ZIC2*, *KLF6*, *MOB3B*, *TGFBR1*, *FZD9*, *BMII*, *SMAD4*, *ITGB1*.

Заключение. В результате было показано, что гены стволовости играют ключевую роль в механизмах дедифференцировки. В процессе дедифференцировки происходит ингибирование ЕМТ и активация экспрессии ключевых генов стволовости. Подавление экспрессии генов стволовости предотвращает дедифференцировку нестволовых опухолевых клеток до прогениторных и стволовых. Кроме того, химические ингибиторы, в комплексе, показали эффективную блокировку дедифференцировки опухолевых клеток линии T47D.

Работа поддержана грантом РНФ № 21-15-00243

Список литературы

1. Hanahan D. Hallmarks of cancer: new dimensions //Cancer discovery. – 2022. – Т. 12. – №. 1. – С. 31-46.
2. Litviakov N. V. et al. Somatic-stem transition of tumor cells is a key link in the metastasis // Annals of Oncology. 2018. V.29. P. VIII682.

MECHANISMS OF DEDIFFERENTIATION OF NON-LIGHT BREAST CANCER CELLS TO STEM CELLS

D.S. Dolgasheva, E.A. Zdereva, I.A. Tsydenova, K.A. Gaptulbarova, M.K. Ibragimova, N.V. Litvyakov

Research Institute of Oncology of the Tomsk State Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia

Abstract

It is known that the ability to dedifferentiate in non-stem cells causes its malignancy and its ability to metastasize [1]. The lack of a tendency to dedifferentiate and detect the affected stem phenotype explains the inability to metastasize within one localization. Previously, we found that the acquisition of the ability to dedifferentiate is a marker of tumor growth to metastasis. This process occurs during ectopic expression of stemness genes due to amplification of their loci in different chromosomes of tumor cells. For the presence of clinical material, it was found that even more amplifications of two chromosomes in the residual rise is associated with a high frequency of metastasis [2]. Thus, the result of the work was the observation of the regulation of the regulation of dedifferentiation of tumor non-stem cells in tumor stem cells in in vitro models.

Keywords: breast cancer, dedifferentiation, metastasis, tumor stem cells, mammospheres, stem genes, gene inhibitors

References

1. Hanahan D. Hallmarks of cancer: new dimensions //Cancer discovery. – 2022. – T. 12. – №. 1. – С. 31-46.
2. Litviakov N. V. et al. Somatic-stem transition of tumor cells is a key link in the metastasis // Annals of Oncology. 2018. V.29. P. VIII682.