

УДК 576.53

ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НЕЙРОСФЕР ГЛИОБЛАСТОМЫ НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ ДЛИННЫХ НЕКОДИРУЮЩИХ РНК MALAT1 И lincROR

© 2023 г. Д. В. Мазур¹, А. В. Мишанова¹, Т. Ф. Коваленко¹,
М. И. Шахпаронов¹, Н. В. Антипова^{1,2,*}

Представлено академиком РАН О.А. Донцовой

Поступило 29.11.2022 г.

После доработки 14.12.2022 г.

Принято к публикации 14.12.2022 г.

Мультиформная глиобластома (МГБ) является наиболее агрессивной злокачественной опухолью головного мозга. Одной из причин устойчивости МГБ к лечению является чрезвычайная гетерогенность опухоли и, в частности, присутствие в общей популяции клеток глиобластомы опухолевых стволовых клеток (ОСК). В данной работе мы исследовали влияние условий, уменьшающих долю ОСК в популяции клеток МГБ, на уровни длинных некодирующих РНК (lincROR и MALAT1), участвующих в формировании фенотипа раковых стволовых клеток глиобластомы. Мы показали, что культивирование в условиях, вызывающих уменьшение стволовости клеток (при добавлении в культуральную среду эмбриональной телячьей сыворотки) влияло на содержание этих транскриптов: в клетках большинства анализируемых линий отмечались снижение уровня позитивного регулятора стволовости lincROR и повышение содержания MALAT1.

Ключевые слова: глиобластома, опухолевые стволовые клетки, lincROR, MALAT1

DOI: 10.31857/S2686738922600960, **EDN:** QFAHLS

Мультиформная глиобластома (МГБ) является наиболее агрессивной злокачественной опухолью головного мозга. Стандартные методы лечения МГБ включают радикальное хирургическое удаление, радиотерапию и химиотерапию алкилирующим препаратом темозоломид [1, 2]. Однако, несмотря на комплексную терапию, средняя продолжительность жизни пациентов, как правило, не превышает 14 мес с момента постановки диагноза, а прогноз в целом остается неблагоприятным [2]. Одной из причин устойчивости МГБ к лечению является чрезвычайная гетерогенность опухоли и, в частности, присутствие в общей популяции клеток глиобластомы опухолевых стволовых клеток (ОСК), для которых характерна повышенная резистентность к химио- и радиотерапии [3]. В связи с этим поиск терапевтических агентов, снижающих долю ОСК или способствующих их дифференцировке в более зрелые клетки опухоли, является крайне актуальной задачей. Также представляется важным исследование ме-

ханизмов поддержания пула ОСК. Среди факторов, регулирующих содержание ОСК в общей популяции раковых клеток, можно выделить ряд длинных некодирующих РНК (днРНК) — не-транслируемых транскриптов длиной 200 нуклеотидов и более [4]. К числу днРНК, повышающих долю ОСК, относится lincROR (Long Intergenic Non-protein Coding RNA, Regulator Of Reprogramming). Данный транскрипт служит позитивным регулятором экспрессии так называемых генов стволовости (SOX2, OCT4 и NANOG) и выполняет онкогенные функции при многих раковых заболеваниях [5, 6]. Ранее в нашей лаборатории было показано, что lincROR повышает уровень ключевого маркера ОСК глиобластомы — CD133 [7], который служит не только одним из поверхностных маркеров ОСК, но и задействован в патогенезе МГБ [8]. Другой днРНК, влияющей на уровень упомянутого маркера, является MALAT1 (Metastasis Associated Lung Adenocarcinoma Transcript 1). MALAT1 известна в качестве онкогена при многих видах рака [9]. В то же время есть данные о том, что при МГБ эта днРНК может выполнять онкосупрессорные функции. Так, обнаружено, что MALAT1 способствует снижению уровня CD133 [10]. В соответствии с этими результатами, биоинформатический анализ базы данных TCGA, проведенный ранее в нашей лабо-

¹ Институт биоорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук, Москва, Россия

² Факультет биологии и биотехнологии,
Высшая школа экономики, Москва, Россия

*e-mail: nadine.antipova@gmail.com

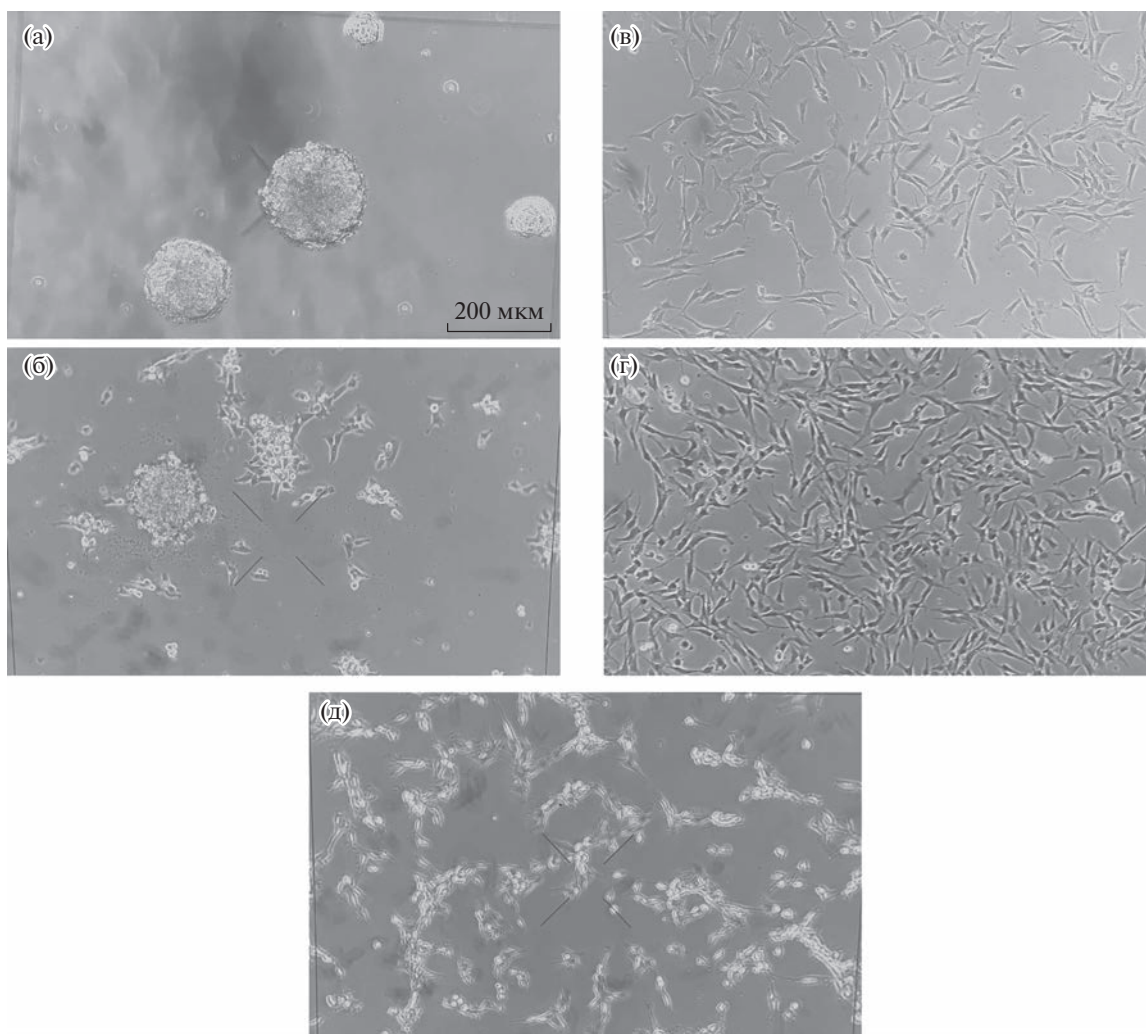


Рис. 1. Изменение морфологии клеток МГБ в различных условиях культивирования. (а) — клетки линии 011 после культивирования в среде DMEM/F12, содержащей 20 нг/мл EGF, 20 нг/мл bFGF, 2% B27 (среда Б), (б) — клетки линии 067 после культивирования в среде Б, (в) — клетки линии 011 после культивирования в среде DMEM/F12 с добавлением 10% FBS (среда А), (г) клетки линии 067 после культивирования в среде А, (д) клетки линии U87MG после культивирования в среде А.

ратории, показал, что пониженный уровень MALAT1 коррелирует с менее продолжительной общей выживаемостью больных МГБ [11].

На основании данных, упомянутых выше, нам представляется важным исследовать влияние различных факторов, способствующих уменьшению содержания в опухоли пула ОСК, на уровни MALAT1 и lincROR. Одним из подходов, позволяющих снизить содержание ОСК в общей популяции клеток МГБ в экспериментах *in vitro*, служит культивирование раковых клеток с использованием среды, содержащей эмбриональную телячью сыворотку (fetal bovine serum, FBS) [12]. Таким образом, целью нашего исследования явился анализ уровней MALAT1 и lincROR в клетках МГБ, культивируемых в жидкой среде DMEM F12, а также в среде DMEM, содержащей 10% FBS. Для этих экспериментов мы использо-

вали линии первичных культур нейросфер МГБ, взятых от 4 пациентов (011, 019, 022 и 067), которые могут служить наиболее репрезентативными моделями опухоли [13]. Две из этих линий относились к наиболее агрессивному, мезенхимальному подтипу МГБ (022 и 067), тогда как клетки линий 011 и 019 принадлежали к менее злокачественному пронеурональному подтипу глиобластомы [14]. Также в работе была использована стандартная иммортализованная линия глиобластомы, U87MG, для которой характерен высокий пролиферативный потенциал и в то же время сниженная гетерогенность (по сравнению с исходной опухолью) [15]. Среда А, содержащая сыворотку, включала DMEM/F12; 2 мМ глутамин; 10% FBS; 100 Ед/мл пенициллина; 100 мг/л стрептомицина. Среда Б содержала DMEM/F12; 2% добавки для обеспечения жизнеспособности нейронов (B27); 2 мМ глутамин; 20 нг/мл эпидер-

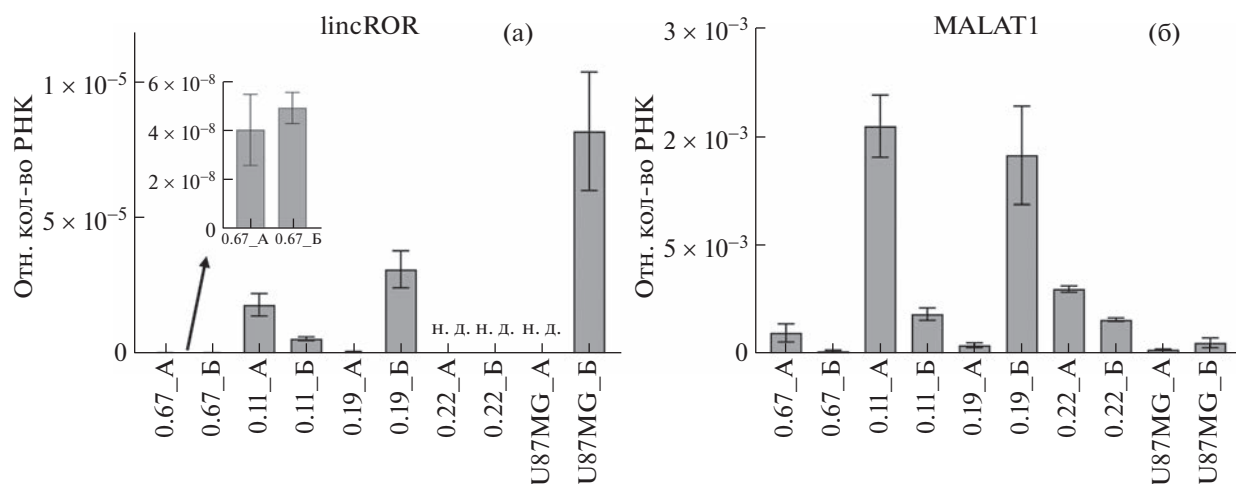


Рис. 2. Экспрессия генов lincROR (а) и MALAT1 (б) в клетках МГБ, выращенных на среде А или Б. В качестве внутреннего контроля использовали 18S РНК.

мального фактора роста (EGF); 20 нг/мл основного фактора роста фибробластов (bFGF); 100 Ед/мл пенициллина; 100 мг/л стрептомицина).

При использовании бессывороточной среды клетки МГБ формировали сфероиды (нейросферы) (рис. 1а, б). В то же время, как и следовало ожидать, после культивирования на среде, содержащей FBS, клетки изменяли морфологию и приобретали фенотип более дифференцированных клеток, имеющих большое количество отростков и образующих адгезионный монослой (рис. 1в – д).

Далее из клеток, выращенных как в среде А, так и в среде Б, была выделена РНК, на матрице которой была синтезирована кДНК, после чего проведен анализ относительных уровней MALAT1 и lincROR с помощью количественной ПЦР (рис. 2).

В результате данного эксперимента было обнаружено, что культивирование на среде, содержащей FBS, приводило к снижению уровня lincROR (по сравнению с клетками, культивируемыми на бессывороточной среде) в 3 из 5 анализируемых линий: 067, 019 и U87 (в линии 022 уровень данного транскрипта не определялся). Это может косвенно свидетельствовать об уменьшении доли ОСК при культивировании клеток данных линий в подобных условиях. Интересно отметить, что при культивировании на среде с FBS уровень MALAT1, напротив, повышался в большинстве анализируемых линий. Следует отметить, что клетки мезенхимального подтипа (022 и 067), для которых характерен высокий уровень стволовости, демонстрировали сходные результаты: содержание MALAT1 повышалось при культивировании на бессывороточной среде. Это может свидетельствовать о том, что дифференцировка ОСК под влиянием компонентов сыворотки может сопровождаться повышением уровня негативного регулятора экспрессии

CD133, MALAT1. В то же время, к нашему удивлению, для клеток с пронеурональным фенотипом (011 и 019) наблюдался различный эффект при культивировании на среде с FBS: в клетках пациента 011 содержание MALAT1 увеличивалось, тогда как в клетках 019 отмечалось снижение уровня этого транскрипта. В случае lincROR при культивировании клеток на среде, содержащей FBS, уровень этой днРНК повышался в клетках пациента 011 и уменьшался в клетках линии 019. Такой результат может быть объяснен чрезвычайной гетерогенностью клеток МГБ: даже клетки, принадлежащие к одному фенотипу, могут обладать разными свойствами и по-разному реагировать на действие различных агентов.

Таким образом, в данной работе мы исследовали уровни известных днРНК (lincROR и MALAT1) в клетках МГБ, культивируемых в различных условиях. Мы показали, что культивирование в условиях, вызывающих уменьшение стволовости клеток (при добавлении в культуральную среду FBS), влияло на содержание этих транскриптов: в клетках большинства анализируемых линий отмечались снижение уровня позитивного регулятора стволовости lincROR и повышение содержания MALAT1. В то же время нельзя не отметить различный эффект, наблюдаемый в случае клеток 011 и 019, относящихся к одному подтипу МГБ, что можно объяснить высокой гетерогенностью этой опухоли. Такие факты следует учитывать как при разработке терапевтических агентов, так и при выборе оптимального метода лечения.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность за предоставление первичных клеточных культур глиобластомы М.С. Павлюкову, ИБХ РАН, Москва.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках Гранта Министерства науки и высшего образования РФ № 075-15-2020-773: “Молекулярно-клеточные механизмы онкологических, иммунных, метаболических заболеваний, моделирование и экспериментальное обоснование методов репрограммирования и онкотаргетинга”.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов. Образцы опухолевых клеток, используемые в данном исследовании, были получены с информированного согласия пациентов в НМИЦ нейрохирургии им. академика Н.Н. Бурденко, протокол 176 от 29 августа 2019 г.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Louis D.N., Perry A., Wesseling P. et al.* // The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Neuro Oncol.* 2021. V. 23. P. 1231–1251.
2. *Simon J.M., Toubiana T., Lang P. et al.* // Radiotherapy for glioblastomas: from radiobiology to concomitant chemotherapy. *Cancer Radiother.* 2005. V. 9. P. 322–331.
3. *Bradshaw A., Wickremsekera A., Tan S.T. et al.* // Cancer Stem Cell Hierarchy in Glioblastoma Multiforme. *Front. Surg.* 2016. V. 3. P. 21.
4. *Rao M.R.S.* // Long non-coding RNA biology. Singapore: Springer Nature. 2017. 323 p.
5. *Loewer S., Cabili M.N., Guttman M., et al.* // Large intergenic non-coding RNA-RoR modulates reprogramming of human induced pluripotent stem cells. *Nat. Genet.* 2010. V. 42. P. 1113–1117.
6. *Chen W., Yang J., Fang H. et al.* // Relevance Function of Linc-ROR in the Pathogenesis of Cancer. *Front. Cell. Dev. Biol.* 2020. V. 8. P. 696.
7. *Kovalenko T.F., Yadav B., Anufrieva K.S. et al.* // Functions of long non-coding RNA ROR in patient-derived glioblastoma cells. *Biochimie.* 2022. V. 200. P. 131–139.
8. *Li Z.* // CD133: a stem cell biomarker and beyond. *Exp. Hematol. Oncol.* 2013. V. 2. P. 17.
9. *Ma R., Zhang B.W., Zhang Z.B. et al.* // LncRNA MALAT1 knockdown inhibits cell migration and invasion by suppressing autophagy through miR-384/GOLM1 axis in glioma. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 2020. V. 24. P. 2601–2615.
10. *Latorre E., Carelli S., Raimondi I. et al.* // The Ribonucleic Complex HuR-MALAT1 Represses CD133 Expression and Suppresses Epithelial-Mesenchymal Transition in Breast Cancer. *Cancer Res.* 2016. V. 76. P. 2626–2636.
11. *Larionova T.D., Bastola S., Aksinina T.E. et al.* // Alternative RNA splicing modulates ribosomal composition and determines the spatial phenotype of glioblastoma cells // *Nat Cell Biol.* 2022. V. 24. P. 1541–1557.
12. *Lee J., Kotliarova S., Kotliarov Y. et al.* // Tumor stem cells derived from glioblastomas cultured in bFGF and EGF more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumors than do serum-cultured cell lines. *Cancer Cell.* 2006. P. 391–403.
13. *Brewer G.J., Torricelli J.R., Evege E.K. et al.* // Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented neurobasal, a new serum-free medium combination. *Journal of Neuroscience Research.* 1993. P. 567–576.
14. *Minata M., Audia A., Shi J. et al.* // Phenotypic Plasticity of Invasive Edge Glioma Stem-like Cells in Response to Ionizing Radiation. *Cell Rep.* 2019. V. 26. P. 1893–1905.
15. *Freedman L.P., Gibson M.C., Ethier S.P. et al.* // Reproducibility: changing the policies and culture of cell line authentication. *Nat Methods.* 2015. V. 12. P. 493–497.

INFLUENCE OF THE CULTIVATION CONDITIONS OF THE GLIOBLASTOMA NEUROSPHERE ON THE EXPRESSION OF MALAT1 AND LINCOR LONG NON-CODING RNA GENES

D. V. Mazur^a, A. V. Mishanova^a, T. F. Kovalenko^a, M. I. Shakhparonov^a, and N. V. Antipova^{a,b,#}

^a Institute of Bioorganic Chemistry named after M.M. Shemyakin and Yu.A. Ovchinnikov, Moscow, Russian Federation

^b Department of Biology and Biotechnology, Higher School of Economics, Moscow, Russian Federation

[#]e-mail: nadine.antipova@gmail.com

Presented by Academician of the RAS O.A. Dontsova

ABSTRACT Glioblastoma multiforme (GBM) is the most aggressive malignant brain tumor. One of the reasons for the resistance of MGB to treatment is the extreme heterogeneity of the tumor and, in particular, the presence of cancer stem cells (CSCs) in the population of glioblastoma cells. In this work, we investigated the effect of conditions that reduce the proportion of CSCs in the GBM cell population on the levels of long non-coding RNAs (lincROR and MALAT1) involved in the formation of the phenotype of glioblastoma cancer stem cells. We have shown that culturing under conditions that cause a decrease in cell stemness (when fetal calf serum is added to the culture medium) affected the content of these transcripts: in the cells of most of the analyzed lines, a decrease in the level of the positive stemness regulator lincROR and an increase in the content of MALAT1 were noted.

Keywords: glioblastoma, cancer stem cells, lincROR, MALAT1