

УДК 577.218

## ДИФФЕРЕНЦИРОВКА НЕЙРОБЛАСТОМЫ IMR32 СОПРОВОЖДАЕТСЯ ГЛОБАЛЬНЫМ ИЗМЕНЕНИЕМ ТРАНСКРИПТОМА

© 2021 г. А. Г. Степченко<sup>1</sup>, Т. Н. Порцева<sup>1</sup>, академик РАН Ю. В. Ильин<sup>1</sup>,  
член-корреспондент РАН С. Г. Георгиева<sup>1</sup>, Е. В. Панкратова<sup>1,\*</sup>

Поступило 11.11.2020 г.  
После доработки 07.12.2020 г.  
Принято к публикации 09.12.2020 г.

Нейробластома — один из наиболее распространенных видов раковых опухолей у младенцев, при котором часто обнаруживается множественная лекарственная устойчивость. Одним из способов лечения нейробластом является создание условий для их дифференцировки. В этой работе мы провели полнотранскриптомный анализ экспрессии генов в недифференцированной и дифференцированной *in vitro* линии клеток нейробластомы IMR-32 человека и определили сигнальные пути и биологические процессы, претерпевающие наибольшие изменения при дифференцировке. Полученные результаты показывают, что формируется сложная гетерогенная популяция нервных клеток, находящихся на разных стадиях дифференцировки. В популяции клеток дифференцирующейся нейробластомы возрастает экспрессия генов, которыми обогащены кортикальные нейрональные прогениторные клетки, одновременно присутствуют клетки, экспрессирующие маркеры ранних постмитотических нейронов. Клетки дифференцируются в нескольких разных направлениях по типу медиатора синаптической передачи. Одновременно при дифференцировке IMR-32 наблюдается усиление транскрипции генов, подавляющих дифференцировку нервных клеток — *Sox2* и *PROM1*, экспрессия которых в норме *in vivo* подавляется.

**Ключевые слова:** нейробластома, дифференцировка, полнотранскриптомный анализ

**DOI:** 10.31857/S2686738921020256

Нейробластома — один из наиболее распространенных видов раковых опухолей у младенцев, возникающая из нейробластов во время эмбрионального развития. Этот рак трудно поддается лечению, часто обнаруживается устойчивость к химиотерапии и является причиной почти 15% смертей от рака у детей. Одним из способов лечения таких опухолей, кроме химиотерапии, является создание условий для активации дифференцировки клеток нейробластомы.

Наша цель — использовать модель дифференцировки нейробластом человека *in vitro* для изучения молекулярных событий и изменений активности различных сигнальных путей, сопровождающих этот процесс. Новые знания о молекулярных путях, регулирующие дифференцировку нейробластомы, могут помочь в разработке инновационных терапевтических подходов и улучшить существующие методы лечения.

Нами был проведен полнотранскриптомный анализ экспрессии генов в недифференцированной и дифференцированной *in vitro* линии клеток нейробластомы IMR-32 человека и определены сигнальные пути и биологические процессы, претерпевающие наибольшие изменения при индуцированной дифференцировке нейробластомы.

В настоящее время используется несколько способов дифференцировки клеток нейробластомы *in vitro*: стимуляция с помощью BrdU, ретиноевой кислоты, культивирование в бессывороточной среде. В клинике для нейробластом, которые проявляют относительную устойчивость к дифференцировке, индуцированной ретиноидами, ведется поиск дополнительных индукторов [1].

IMR32 относительно устойчива к дифференцировке, индуцированной ретиноевой кислотой, поэтому мы использовали для индукции дифференцировки 5-бром-2'-дезоксисуридин (BrdU). Клеточная линия нейробластомы человека IMR-32 претерпевает заметную дифференцировку в ответ на BrdU [2]. BrdU индуцирует морфологическую дифференцировку, а также увеличение количества потенциал-зависимых Ca<sup>2+</sup>-каналов [2]. Кроме того, BrdU вызывает повышение со-

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук (ИМБ РАН), Москва, Россия  
\*e-mail: panliz@mail.ru

держания нейромедиаторов [3]. Клетки IMR-32 приобретают регулируемые секреторные свойства после дифференцировки, индуцированной *in vitro*: они собирают секреторные органеллы “*de novo*” и способны накапливать дофамин и высвобождать нейротрансмиттер в ответ на стимулы. Между дифференцированными клетками формируются специализированные клеточные контакты [4, 3]. Дифференцировка нейронов вызывает активацию Ca<sup>2+</sup>-каналов [4, 2].

При дифференцировке нейробластомы *in vitro* происходит активации Akt и ERK1/2. Как известно, PI3K-Akt играет важную роль в перестройках цитоскелета, необходимых для дифференцировки [5]. Кроме того, в клетках дифференцированной IMR-32 снижаются уровни экспрессии факторов транскрипции протоонкогена MYCN и c-MYB (c-myb) [6].

Для изучения изменения экспрессии генов при дифференцировке нейробластомы IMR32 (Российская коллекция культур клеток, Институт цитологии, Санкт-Петербург, Россия) было проведено полнотранскриптомное секвенирование (RNA-Seq). Были выполнены три независимых биологических повтора для дифференцированной IMR32 и для недифференцированной IMR32. Клетки IMR32 культивировали в среде MEM, содержащей 10% FBS, 100 Ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина. Дифференцировку нейробластомы IMR32 проводили в той же культуральной среде при добавлении 2.5 мкМ BrdU в течение 16 дней, среду для культивирования меняли каждые 3 дня.

мРНК выделяли с использованием модуля магнитной изоляции мРНК NEBNext Poly (A) (NEB#E7490). NEBNext Ultra II Directional RNA Library Prep Kit для Illumina (NEB#E7760) использовали 3 мкг тотальной РНК для создания библиотек для секвенирования. Библиотеки РНК были подготовлены для секвенирования с использованием стандартных протоколов Illumina. Двухцепочечную кДНК, продукты реакции лигирования и продукты реакции ПЦР очищали с использованием гранул AgencourtAMPure XP.

Распределение библиотек кДНК по размеру оценивали после ПЦР (12 циклов) с использованием Agilent BioAnalyzer. Профили мРНК 16-дневной дифференциации клеток нейробластомы IMR32 и недифференцированной нейробластомы IMR32 были получены путем глубокого секвенирования в трех повторах с использованием Illumina NovaSeq. Для каждого образца было получено от 28 до 35 млн прочтений. Картирование полученных последовательностей в геном человека (hg38) выполнялось с использованием программного обеспечения hisat. Полученные данные были использованы для функционального анализа дифференциально экспрессиру-

ющихся генов (ДЭГ), который был проведен с использованием следующих интернет-ресурсов: (GO; DAVID (david.abcc.ncifcrf.gov/home.jsp); GOTERM BP FAT (биологический процесс) и KEGG Pathway (www.genome.jp/kegg/pathway.html)). Программа DAVID рассчитывает модифицированное точное P-значение Фишера, чтобы выявить обогащение GO или молекулярного пути. В качестве критерия отсечения было выбрано значение  $p < 0.01$ .

Данные RNA-Seq (доступны в GEO, номер GSE161759) показали, что при дифференцировке нейробластомы IMR32 в течение 16 дней *in vitro* изменяется транскрипция 3748 генов с FDR <0.01 (значение  $p$ , скорректированное для множественного тестирования). Уровни транскрипции 2482 генов увеличились, тогда как уровни транскрипции 1266 генов снизились.

Анализ ДЭГ (Functional Annotation DAVID Bioinformatic Resources 6.8) показал, что дифференцировка IMR32 приводит к массивной активации генов, вовлеченных в процессы нейрональной дифференцировки и всех сопровождающих ее событий: генерация нейронов, организацию и формирование синапсов, синаптическую передачу, регуляцию транс-синаптической передачи, клеточную адгезию, регуляцию межклеточной коммуникации. Активация генов при дифференцировке IMR32 не ограничивается исключительно нейроспецифическими процессами, но также затрагивает гены, которые участвуют в органогенезе у приматов (рис. 1).

Анализ полнотранскриптомных изменений при дифференцировке нейробластомы показывает, что в результате формируется сложная гетерогенная популяция нервных клеток, находящихся на разных стадиях дифференцировки. В популяции клеток дифференцирующейся нейробластомы экспрессируются гены, которыми обогащены кортикальные нейрональные прогениторные клетки: радиальные глиальные клетки и промежуточные клетки-предшественники нейронов коры больших полушарий головного мозга: *FDZ8*, *HES1*, *HOPX*, *PDGFD*, *PROM1*, *Sox2*, *TNC*, *VIM*, *ALDOC*, *BTG2*, *FABP7*, *EGR1*, *FOS*, *POU3F2*, *RND* [7]. Например, *FABP7* необходим для создания системы радиальных глиальных волокон в развивающемся мозге для миграции незрелых нейронов с целью образования корковых слоев. Понижается экспрессия гена *Pax6*, экспрессия которого *in vivo* подавляется при дифференцировке в промежуточные клетки-предшественники нейронов. Одновременно присутствуют клетки, экспрессирующие маркеры ранних постмитотических нейронов: *NeuroD1*, *nhlh1*, *lhx9*, *POU3F1*, *MYTIL*, *lno3*, *lnoD1*, *lhx8* [8].

Важно отметить, что нейрональные клетки дифференцируются в нескольких разных направ-

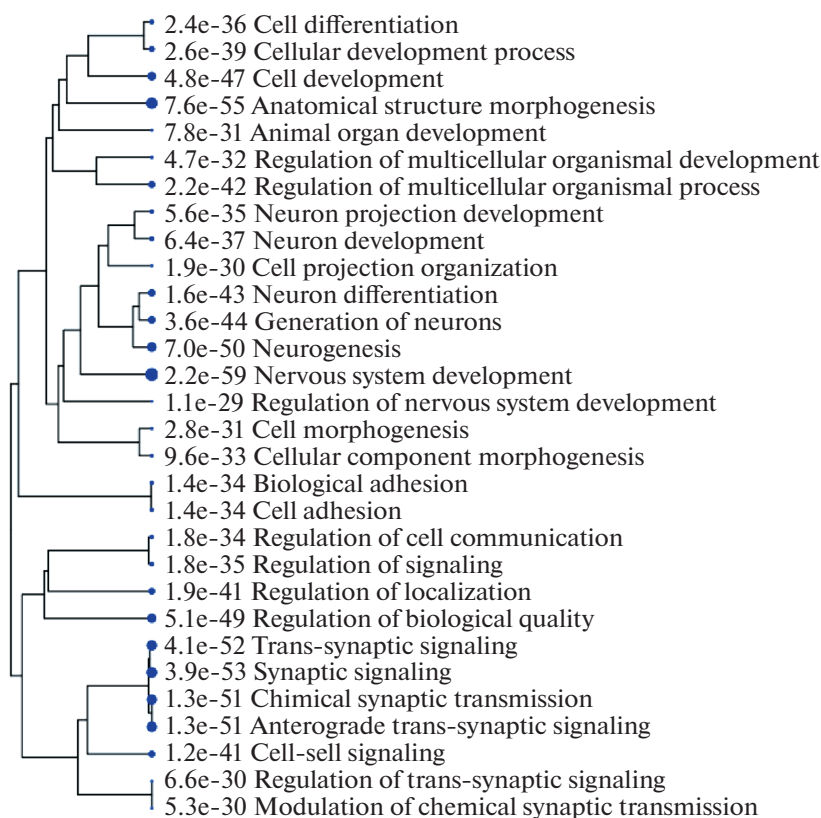


Рис. 1. GO\_terms\_Tree – 30 наиболее значимых кластеров обогащения дифференциально экспрессирующихся генов. Цифры означают – Log<sub>2</sub> p-Value для каждого кластера (биологического процесса).

лениях по типу медиатора синаптической передачи. Формируются серотонинэргические клетки, дофаминэргические клетки, глутаматэргические клетки, ГАВА-эргические и холинэргические клетки. Дифференцировка IMR32 приводит к увеличению экспрессии генов, которые участвуют в химической синаптической передаче и взаимодействиях нейроактивный лиганд-рецептор.

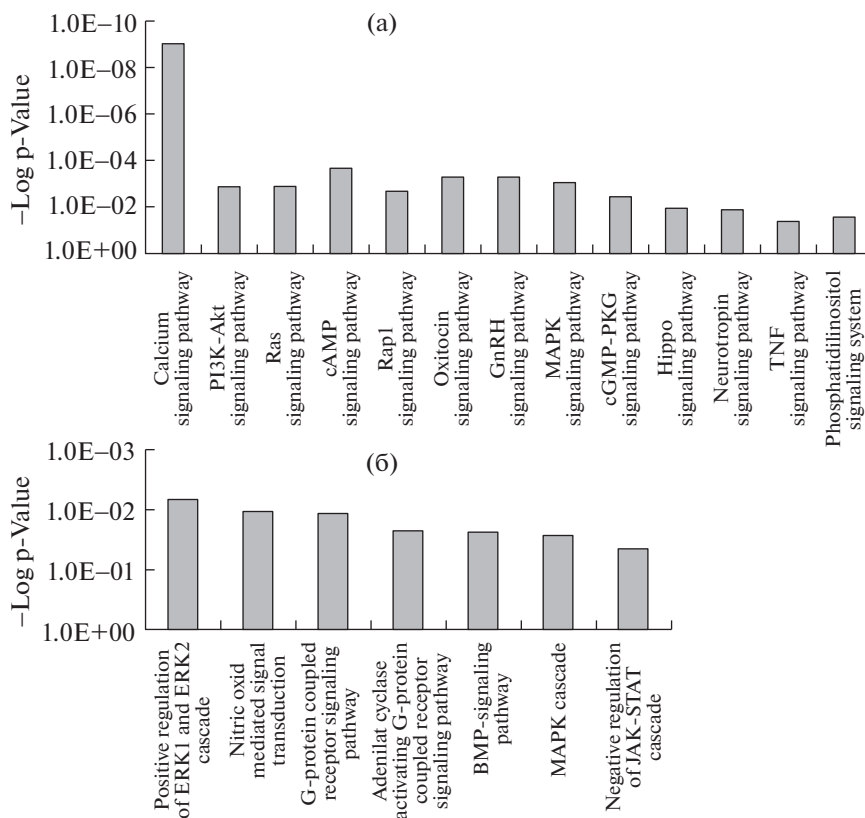
Дифференцировка IMR32 активирует гены, которые отвечают за взаимодействие нервных клеток друг с другом, с внеклеточным матриксом, а также гены, участвующие в перестройке внеклеточного матрикса. Функциональный анализ генов показал, что согласно DAVID Bioinformatic Resource 6.8 для активированных генов, изменения происходят в следующих клеточных процессах (GOTEM\_BP\_DIRECT): организация и разборка внеклеточного матрикса (*HTRA1*, *TIMP2*, *TIMP3*, *VCAN*, *DCN*, *ENG*, *FNI*, *GSN*, *KLK4*, *MMP15*, *MMP2*, *MMP10*), адгезия к клеточному матриксу (*COL3A1*, *COL5A1*, *COL5A3*, *COL6A5*, *COL6A3*, *COL9A1*, *COL6A6*, *ECM2*, *FBLN5*), интегрины (*ITGA2*, *ITGA3*, *ITGA6*, *ITGA8*, *ITGA5*, *ITGB5*, *ITGA11* и *NPNT*), гены, участвующие в катаболических процессах коллагена, в регуляции миграции клеток (KEGG\_PATHWAY). Следова-

тельно, дифференцировка IMR32 регулирует динамику фокальной адгезии и миграцию дифференцирующихся нервных клеток.

Дифференцировка нейробластомы IMR32 сопровождается активацией сигнальных путей, которые вовлечены в нейрогенез и регулируют пролиферацию, дифференцировку и выживание нервных клеток (рис. 2а, 2б).

Дифференцировка клеток IMR32 приводит к замедлению клеточных делений и к подавлению экспрессии 1266 генов, большая часть которых связана с клеточным циклом. Значительно подавляется экспрессия генов *E2F1*, *E2F2*, *E2F7*, *c-Myb*. Гены с пониженной регуляцией связаны с такими процессами, как деление клетки, переход G1/S, переход G2/M (GOTEM\_BP\_DIRECT); клеточный цикл (1.2E-18) и репликация ДНК (6.6E-20) (KEGG\_PATHWAY).

Из полученных результатов следует, что нейробластные клетки IMR-32 в процессе дифференцировки *in vitro* приобретают характеристики гетерогенной популяции дифференцирующихся нейронов человека и могут использоваться для изучения экспрессии генов и активации сигнальных внутриклеточных систем в процессе развития.



**Рис. 2.** Функциональный анализ обогащения дифференциально экспрессируемых генов для дифференцированной нейробластомы IMR32. Генная онтология (GO) KEGG Pathway (сигнальные пути) (а) и GOTERM BP FAT (биологический процесс) (б) для активированных дифференциально экспрессирующихся генов.

Однако следует отметить, что при дифференцировке клеток IMR-32 наблюдается усиление транскрипции некоторых генов, экспрессия которых в норме при дифференцировке нейрональных клеток *in vivo* подавляется. Например, увеличивается экспрессия *Sox2*, который сохраняет нервные клетки недифференцированными и подавляет дифференцировку нейронов. Увеличивается экспрессия *PROM1*, который выполняет функцию поддержания свойств стволовых клеток. В клетках нейробластомы *PROM1* подавляет клеточную дифференцировку зависимым от *RET* образом [9].

Таким образом, в гетерогенной популяции дифференцирующихся клеток нейробластомы присутствуют клетки, дифференцировка которых подавляется. Учитывать существование таких клеток в популяции дифференцирующейся нейробластомы важно при разработке тактики лечения и подборе альтернативного комбинированного подхода для пациентов с нейробластомой. Устойчивость таких опухолей к комбинированной терапии может возникать в результате присутствия в популяции низкодифференцированных клеток, которые плохо поддаются дифференцировке и устойчивы к химиотерапии. Важно

определить факторы, максимально снижающие в популяции клеток дифференцирующейся нейробластомы экспрессию генов, характерных для кортикальных нейрональных прогениторных клеток.

Также важно отметить, что нейробластомы обычно лечат путем индукции дифференцировки с помощью ретиноевой кислоты (РА), однако, не все нейробластомы хорошо отвечают на индукцию РА. Ретиноевая кислота, также как BrdU, не подавляет экспрессию *Sox2* в клетках IMR-32. Однако эффективным для подавления *Sox2* является оверэкспрессия *PPARβ/δ*. Предполагают, что комбинаторная активация как *RARα*, так и *PPARβ/δ* может быть подходящей в качестве альтернативного терапевтического подхода для пациентов с резистентной к ретиноидам нейробластомой [10]. Для таких нейробластом необходим поиск дополнительных индукторов. Было предложено использование силденафила [1] и экстракта *Tinospora cordifolia* [11] для дифференцировки нейробластом, устойчивых к РА. Также использование тидеглусиба для лечения нейробластом [12]

Новые знания о молекулярных путях, регулирующих развитие и прогрессирование нейробла-

стомы, позволят разработать инновационные терапевтические подходы и улучшить существующие методы лечения. Наши результаты могут быть применены для улучшения терапии индукции дифференцировки для пациентов с нейробластомами.

#### ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований (грант №18-04-01306) и гранта российского научного фонда (грант №19-14-00365).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Dar M.I., Jan S., Reddy G.L., et al.* Differentiation of human neuroblastoma cell line IMR-32 by sildenafil and its newly discovered analogue IS00384. // *Cell Signal.* 2020. V.65. P. 109425. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2019.109425>
2. *Louhivuori L.M., Bart G., Larsson K.P., et al.* Differentiation dependent expression of TRPA1 and TRPM8 channels in IMR-32 human neuroblastoma cells. // *J Cell Physiol.* 2009. V. 221. P. 67–74.
3. *Gotti C., Sher E., Cabrini D., et al.* Cholinergic receptors, ion channels, neurotransmitter synthesis, and neurite outgrowth are independently regulated during the *in vitro* differentiation of a human neuroblastoma cell line. // *Differentiation.* 1987. V. 34. P. 144–155.
4. *Sher E., Denis-Donini S., Zanini A., et al.* Human neuroblastoma cells acquire regulated secretory properties and different sensitivity to Ca<sup>2+</sup> and alpha-latrotoxin after exposure to differentiating agents. // *J Cell Biol.* 1989. V. 108. P. 2291–2300.
5. *Kotapalli S.S., Dasari C., Duscharla D., et al.* All-Trans-Retinoic Acid Stimulates Overexpression of Tumor Protein D52 (TPD52, Isoform 3) and Neuronal Differentiation of IMR-32 Cells. // *J Cell Biochem.* 2017. V. 118. P. 4358–4369.
6. *Aygun N., Altungoz O.* MYCN is amplified during S phase, and c-myc is involved in controlling MYCN expression and amplification in MYCN-amplified neuroblastoma cell lines. // *Mol Med Rep.* 2019. V. 19. P. 345–361.
7. *Florio M., Heide M., Pinson A., et al.* Evolution and cell-type specificity of human-specific genes preferentially expressed in progenitors of fetal neocortex. // *Elife.* 2018. V. 7. P. e32332. <https://doi.org/10.7554/eLife.32332>
8. *Abranches E., Silva M., Pradier L., et al.* Neural differentiation of embryonic stem cells *in vitro*: a road map to neurogenesis in the embryo. // *PLoS One.* 2009. V. 4. P. e6286. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006286>
9. *Takenobu H., Shimozaoto O., Nakamura T., et al.* CD133 suppresses neuroblastoma cell differentiation via signal pathway modification. // *Oncogene.* 2011. V. 30. P. 97–105.
10. *Yao P.L., Chen L., Dobrzański T.P., et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor-β/δ inhibits human neuroblastoma cell tumorigenesis by inducing p53- and SOX2-mediated cell differentiation. // *Mol Carcinog.* 2017. V. 56. P. 1472–1483.
11. *Mishra R., Kaur G.* *Tinospora cordifolia* Induces Differentiation and Senescence Pathways in Neuroblastoma Cells. // *Mol Neurobiol.* 2015. V. 52. P. 719–733.
12. *Mathuram T.L., Ravikumar V., Reece L.M., et al.* Tideglusib induces apoptosis in human neuroblastoma IMR32 cells, provoking sub-G0/G1 accumulation and ROS generation. // *Environ Toxicol Pharmacol.* 2016. V. 46. P. 194–205.

## DIFFERENTIATION OF IMR32 NEUROBLASTOMA IS ACCOMPANIED BY A GLOBAL CHANGE IN THE TRANSCRIPTOME

A. G. Stepchenko<sup>a</sup>, T. N. Portseva<sup>a</sup>, Academician of the RAS Yu. V. Ilyin<sup>a</sup>,  
Corresponding Member of RAS S. G. Georgieva<sup>a</sup>, and E. V. Pankratova<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> *Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation*

<sup>\*</sup>*e-mail: panliz@mail.ru*

Neuroblastoma is one of the most common cancers in infants and is often multidrug-resistant. One of the methods of treating neuroblastomas is to create conditions for their differentiation. In this work, we performed a full-transcriptome analysis of gene expression in an undifferentiated and differentiated *in vitro* human neuroblastoma cell line IMR-32 and identified the signaling pathways and biological processes that undergo the greatest changes during differentiation. The results obtained show that a complex heterogeneous population of nerve cells is being formed at different stages of differentiation. In the cell population of differentiating neuroblastoma, the expression of genes with which cortical neuronal progenitor cells are enriched increases; at the same time, there are cells expressing markers of early postmitotic neurons. Cells differentiate in several different directions according to the type of synaptic mediator. At the same time, during the differentiation of IMR-32 cells, there is an increase in the transcription of genes that suppress the differentiation of nerve cells – *Sox2* and *PROM1*, the expression of which is normally suppressed during *in vivo* differentiation.

*Keywords:* neuroblastoma, differentiation, full transcriptome analysis