

УДК 576.32/.36

Исследование активации сигнальных путей в TRAIL-резистентных макрофагоподобных клетках острого миелоидного лейкоза

Я. В. Ломовская^{1*}, К. С. Краснов¹, М. И. Кобякова^{1,2}, А. А. Колотова¹, А. М. Ермаков¹, А. С. Сенотов¹, И. С. Фадеева¹, Е. И. Фетисова¹, А. И. Ломовский¹, А. И. Звягина¹, В. С. Акатов¹, Р. С. Фадеев¹

¹Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Московская обл., 142290 Россия

²Институт клинической и экспериментальной лимфологии – филиал Института цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, 630060 Россия

*E-mail: yannalomovskaya@gmail.com

Поступила в редакцию 01.11.2023

Принята к печати 31.01.2024

DOI: 10.32607/actanaturae.27317

РЕФЕРАТ Острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) – злокачественное новообразование, которое характеризуется крайне низкой излечиваемостью и выживаемостью. Воспалительное микроокружение и индуцированное им созревание (дифференцировка) клеток ОМЛ способствует уклонению этих клеток от эффекторов противоопухолевого иммунитета. Один из ключевых молекулярных эффекторов иммунного надзора – цитокин TRAIL – рассматривается в качестве перспективной платформы для создания селективных противоопухолевых препаратов. Ранее в *in vitro* условиях воспалительного микроокружения – в трехмерной высокоплотной культуре клеток ОМЛ ТНФ-1, нами было показано появление дифференцированных макрофагоподобных клонов ТНФ-1ad, устойчивых к TRAIL-индуцированной гибели. В представленной работе в устойчивых к действию TRAIL макрофагоподобных клетках ОМЛ ТНФ-1ad обнаружены конститутивная активация провоспалительных сигнальных путей, ассоциированных с ними транскрипционных факторов, и повышение экспрессии антиапоптотического гена *BIRC3*. Впервые с помощью биоинформатического анализа транскриптома выявлен основной регулятор – ген *IL1B*, связывающий провоспалительную активацию и формирование устойчивости к TRAIL у макрофагоподобных клеток ТНФ-1ad.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА острый миелоидный лейкоз, TRAIL-индуцированный апоптоз, транскриптом, воспаление.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ОМЛ – острый миелоидный лейкоз; TRAIL – цитокин семейства факторов некроза опухоли, лиганд, вызывающий апоптоз; ТФ – транскрипционный фактор; ИНФ – интерферон; ИЛ – интерлейкин; FDR – частота ложноположительных результатов; ДЭГ – дифференциально экспрессируемый ген; ББВ – белок-белковые взаимодействия.

ВВЕДЕНИЕ

Острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) – злокачественное заболевание крови, которое характеризуется крайне низкой излечиваемостью и выживаемостью [1]. Несмотря на достигнутый за последнее десятилетие прогресс в терапевтических стратегиях, общая пятилетняя выживаемость наблюдается только у 30% пациентов с диагнозом ОМЛ [2]. Для ОМЛ характерна неконтролируемая клональная экспансия и накопление (гиперклеточность) злокачественно трансформированных гемопоэтических

клеток-предшественников в костном мозге и периферической крови. Хорошо известно, что при остром миелоидном лейкозе костный мозг приобретает характеристики поврежденной ткани с признаками хронического воспаления [3, 4]. Воспалительный процесс в костном мозге способствует уклонению опухолевых клеток от гибели, индуцированной как противоопухолевыми препаратами, так и компонентами противоопухолевого иммунитета, и, следовательно, является маркером неблагоприятного прогноза течения заболевания [5–7]. Известно так-

же, что в условиях воспаления активация провоспалительных внутриклеточных сигнальных путей может приводить к миелоидной дифференцировке здоровых гемопоэтических клеток-предшественников [8–10]. В последнее время появляются данные о том, что клетки ОМЛ с дифференцированным (зрелым) миелоидным фенотипом могут подавлять активность противоопухолевого иммунитета, а также они более устойчивы к действию ряда противоопухолевых препаратов [11–13].

Одним из ключевых молекулярных компонентов противоопухолевого иммунитета является индуцирующий апоптоз лиганд (TRAIL), родственный фактору некроза опухоли (ФНО). Цитокин TRAIL связывается с четырьмя мембраносвязанными рецепторами: проапоптотическими DR4 и DR5 и антиапоптотическими DcR1 и DcR2, а также с растворимым антиапоптотическим «рецептором» остеопротегерином [14]. Уникальность цитокина TRAIL заключается в его способности к селективной индукции гибели опухолевых и трансформированных клеток при отсутствии цитотоксического действия на здоровые клетки организма. Данное свойство весьма привлекательно и перспективно для разработки высокоактивных агонистов проапоптотических TRAIL-рецепторов, что, в свою очередь, крайне важно для снижения серьезных неспецифических побочных эффектов иммунобиологических противоопухолевых препаратов [15, 16].

Ранее нами было показано, что в клетках ОМЛ ТНР-1 в условиях *in vitro*, в трехмерной высокоплотной культуре, имитирующей гомотипическую межклеточную коммуникацию при гиперплазии лейкозных бластов в костном мозге, происходят повышение продукции провоспалительных цитокинов, хемокинов и ростовых факторов, активация провоспалительных NF- κ B-зависимых сигнальных путей и обратимое повышение устойчивости как к TRAIL-индуцированной гибели, так и к действию химиотерапевтических препаратов [17, 18]. Кроме того, нами показано, что в трехмерной высокоплотной культуре этих клеток появляются макрофагоподобные клоны ТНР-1ad, обладающие конститутивной устойчивостью к TRAIL-индуцированной гибели [19]. Известно также, что дифференцировка клеток ОМЛ способствует повышению их устойчивости к TRAIL-индуцированной гибели [20, 21].

Таким образом, исходя из опубликованных данных и собственных результатов, мы предполагаем, что провоспалительное микроокружение клеток ОМЛ, сымитированное в условиях трехмерной высокоплотной клеточной культуры *in vitro*, может индуцировать созревание клеток и приводить к появлению новых клеточных клонов, устойчивых

к цитотоксическому действию противоопухолевого цитокина TRAIL. В данной работе с использованием биоинформатического анализа транскриптомов макрофагоподобных клеток ТНР-1ad, образовавшихся в условиях провоспалительного микроокружения и устойчивых к TRAIL-индуцированной гибели, выявлены основные сигнальные пути и ключевые молекулярные участники, ассоциированные с активацией путей выживания.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Клеточные культуры

Клетки острого миелоидного лейкоза человека ТНР-1 (TIB-202) получены из АТСС (США). Пролиферирующие макрофагоподобные клоны ТНР-1ad получены как указано ранее [19]. Клетки культивировали в среде RPMI 1640/F12 (Sigma, США) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (FBS) (Gibco, США), 40 мкг/мл гентамицина сульфата (Sigma) при 37°C и 5% CO₂ в воздухе. Непролиферирующие макрофагоподобные клетки ТНР-1PMA получали путем инкубации клеток ТНР-1 с 200 нМ форболового эфира (Sigma) в течение 96 ч. Для провоспалительной активации клеток ТНР-1 культивировали в присутствии 10 мкг/мл ЛПС из *Escherichia coli* O111:B4 (Sigma) в течение 24 ч.

Секвенирование транскриптомов клеток

Секвенирование РНК для последующей оценки транскриптомов клеток проводили в ООО «Геноаналитика» с использованием секвенатора HiSeq 1500 (Illumina, США). Секвенирование РНК каждой из двух исследованных групп клеток выполняли в трех биологических повторностях.

Анализ дифференциальной экспрессии генов

Для идентификации различий в экспрессии генов между макрофагоподобными клонами ТНР-1ad и родительскими клетками ТНР-1 проведены кластерный анализ и анализ методом главных компонент с использованием языка программирования Python (в. 3.10.5) и пакета Scikit-learn (в. 1.3.2) (рис. 1).

Для исследования активации сигнальных путей в макрофагоподобных клонах ТНР-1ad в сравнении с родительскими клетками ТНР-1 использовали анализ обогащения по функциональной принадлежности (GSEA), так как в данном методе анализируются все изменяющиеся гены, а не только гены, кратность изменений которых превышает определенный порог [22]. В работе анализировали наборы генов из коллекций H (Hallmark) и C3 (наборы генов

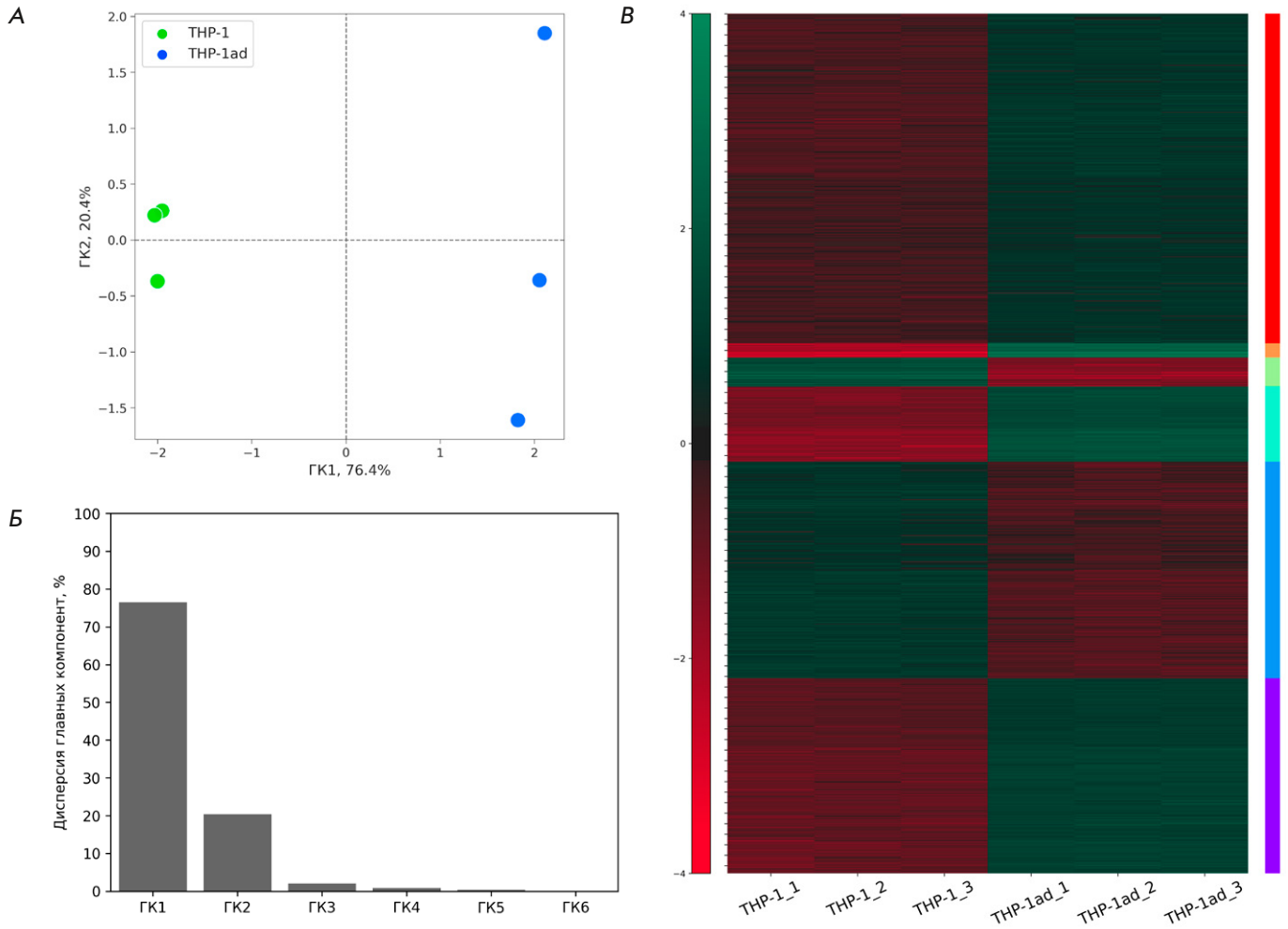


Рис. 1. Оценка различий в экспрессии генов в клетках THP-1ad и THP-1. Метод главных компонент на основе данных экспрессии генов, показывающий различия в экспрессии в двух экспериментальных группах (А). Распределение дисперсии между главными компонентами (Б). Кластеризация ДЭГ с достоверными изменениями экспрессии (В)

Transcription Factor Targets) базы данных молекулярных сигнатур MSigDB (<https://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/human/collections.jsp>) с использованием пакета программ для языка программирования Python (вер. 3.10) GSEApy (вер. 1.0.5). В качестве критерия активации сигнальных путей и транскрипционных факторов (ТФ) использовали значение показателя обогащения. Дополнительно применяли нормализованный показатель обогащения (НПО), который позволяет сопоставлять наборы генов, содержащих различное количество генов. Чем больше значение НПО или показателя обогащения, тем выше вероятность активации сигнального пути или ТФ.

С целью определения дифференциально экспрессируемых генов (ДЭГ), продукты которых могут принимать участие в регуляции исследуемых

сигнальных путей, построены сети белок-белковых взаимодействий (ББВ) и проанализировано их функциональное взаимодействие для идентификации центральных регулирующих элементов. Использовали базу данных STRINGdb (<https://string-db.org/>), программное обеспечение Cytoscape (вер. 3.10.0) и подключаемый модуль CytoHubba [23].

Количественная ПЦР с обратной транскрипцией

Тотальную РНК выделяли с использованием набора innuPREP RNA Mini Kit 2.0 (Analytik Jena, Германия). кДНК синтезировали и амплифицировали с использованием набора OneTube RT-PCR SYBR («Евроген», Россия) на приборе QuantStudio 5 Real-Time PCR (Thermo Scientific, США) согласно инструкции производителя. Олигонуклеотидные праймеры, используемые в исследовании, были

Таблица 1. Олигонуклеотидные праймеры, использованные в работе

Олигонуклеотид	Нуклеотидная последовательность 5'→3'
NAIP-F	GGGGACTTCGTCTGGGATTC
NAIP-R	CTGGCCAGTGGAAGGAAAGT
CIAP1-F	CTGATTCCCGGCTCTGCG
CIAP1-R	AGCACGAGCAAGACTCCTTT
CIAP2-F	TCCATGGGTTC AACATGCCA
CIAP2-R	CTCCTGGGCTGTCTGATGTG
XIAP-F	TGGCGCTCATCGAGGGA
XIAP-R	TGTCTGCAGGTACACAAGTTT TAG
Survivin-F	TTCAAGGAGCTGGAAGGCTG
Survivin-R	GCAACCGGACGAATGCTTTT
BRUCE-F	AGAAAGGGATGATGCAAGTACG
BRUCE-R	CTACCTGGGCTGCTGAACTC
Livin-F	GGCCTCCTTCTATGACTGGC
Livin-R	GCAGAAGAAGCACCTCACCT
ILP-2-F	GGAGAGGAAAAGCGTTGTGC
ILP-2-R	TCTTCACTATGCATGGCGGG
BCL2-F	CAACATCGCCCTGTGGATGA
BCL2-R	CCGTACAGTCCACAAAGGC
BCL2L1-F	GGCTTGTTCGGGAGAGACG
BCL2L1-R	CACTGAGTCTCGTCTCTGGTT
MCL1-F	TGGAGACCTTACGACGGGTT
MCL1-R	AGCACATTCCTGATGCCACC
BCL2L2-F	CGACTGTGACTCTGCTGCAA
BCL2L2-R;	TCTCCCTGACTCGAGCTTTG
BCL2A1-F	GGATAAGGCAAAACGGAGGC
BCL2A1-R	TCTTCTTGTGGGCCACTGAC

синтезированы в ЗАО «Евроген» и представлены в табл. 1.

Статистический анализ

Результаты представляли в виде среднего ± стандартное отклонение (M±SD). Опыты проводили не менее чем в пяти повторах (n≥5). Статистическую значимость различий определяли с помощью одностороннего ANOVA с последующим множественным сравнением Холма–Сидака, p < 0.05. Статистическую значимость изменений экспрессии генов оценивали с применением теста Вальда с поправкой на множественное сравнение Беньямини–Хохберга (FDR) ≤ 0.05 [24].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выявление наиболее активированных сигнальных путей в макрофагоподобных клонах ТНР-1ad

Ранее нами было показано формирование в условиях трехмерных высокоплотных культур клеток ОМЛ ТНР-1 *in vitro* макрофагоподобных клонов ТНР-1ad, обладающих повышенной устойчивостью к TRAIL-индуцированной гибели [19]. Для определения основных сигнальных путей и потенциальных механизмов TRAIL-резистентности макрофагоподобных клонов ТНР-1ad проведено секвенирование транскриптомов данных клеток с последующим анализом дифференциальной экспрессии генов в сравнении с родительскими клетками ТНР-1.

Для идентификации активности внутриклеточных сигнальных путей проведен анализ обогащения по функциональной принадлежности (GSEA) базы данных MSigDB [25] на всем наборе данных секвенирования транскриптомов, который позволяет оценить активацию/деактивацию исследуемого сигнального пути или всех исследуемых генов-мишеней за счет учета даже незначительных изменений транскрипционной активности [22].

Анализ обогащения по функциональной принадлежности, проведенный с использованием коллекции H, показал, что в макрофагоподобных клонах ТНР-1ad наибольший положительный нормализованный показатель обогащения (НПО) имели наборы генов сигнальных путей Interferon alfa response (НПО 2.13), IL6 JAK STAT3 signaling (НПО 2.06), Inflammatory response (НПО 2.01), Interferon gamma response (НПО 1.98) и TNFA signaling via NF-KB (НПО 1.96) (рис. 2А), что указывает на активацию данных сигнальных путей. Хорошо известно, что активность идентифицированных сигнальных путей характерна для провоспалительной активации клеток [26–28]. Также мы обнаружили, что в макрофагоподобных клонах ТНР-1ad происходило подавление активности сигнальных путей MYC targets V1 (НПО -2.86), MYC targets V2 (НПО -2.83) и Oxidative phosphorylation (НПО -2.03), о чем свидетельствует наибольшее отрицательное значение НПО. Подавление данных сигнальных путей также характерно для провоспалительной активации клеток и повышения устойчивости к TRAIL-индуцированной гибели [29–31].

Для идентификации наиболее вероятных ТФ, контролирующей экспрессию генов из наборов с наибольшим положительным НПО, то есть непосредственно принимающих участие в активации вышепредставленных сигнальных путей в макрофагоподобных клонах ТНР-1ad, проведен анализ

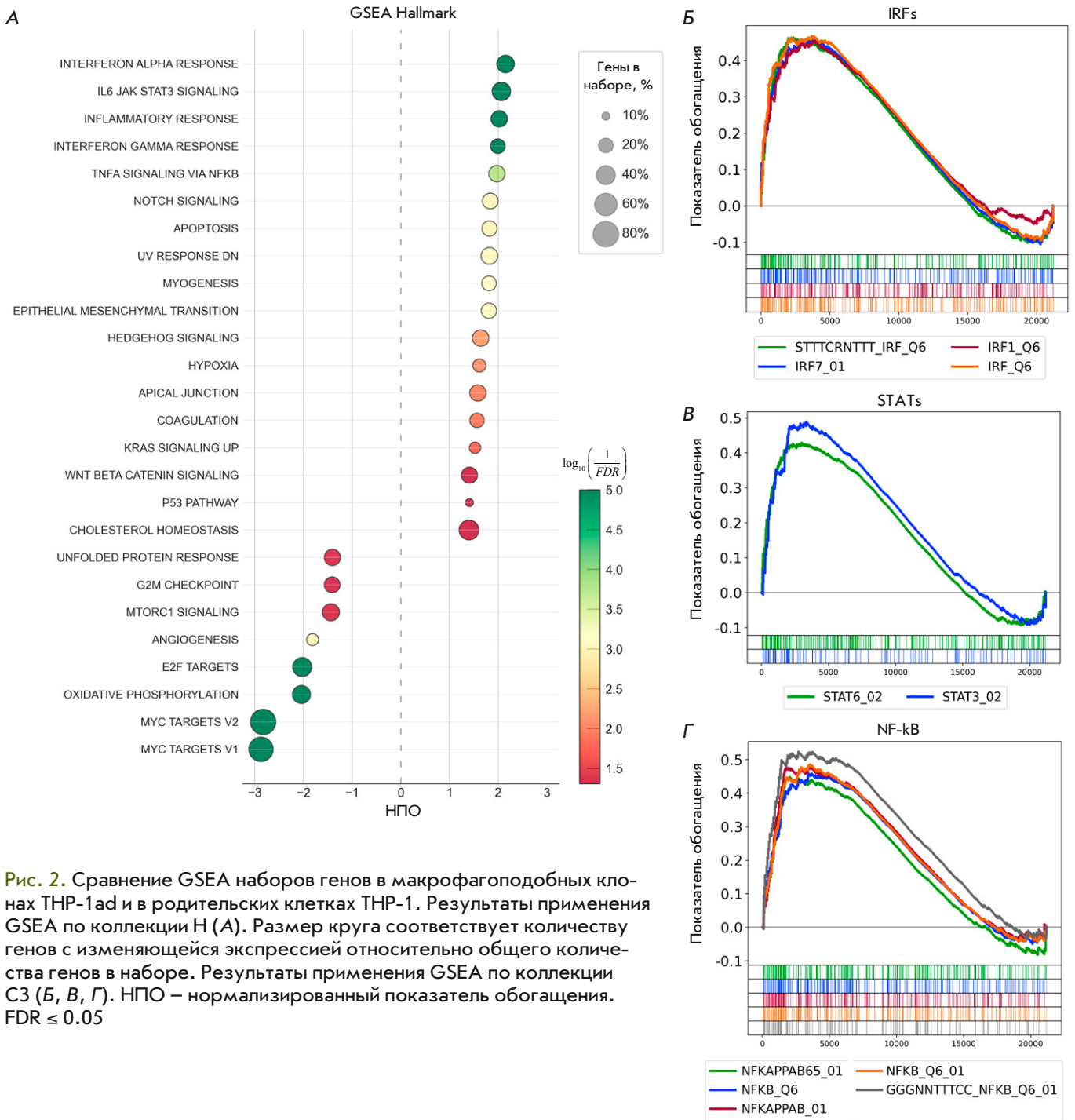


Рис. 2. Сравнение GSEA наборов генов в макрофагоподобных клон-ах THP-1ad и в родительских клетках THP-1. Результаты применения GSEA по коллекции Н (А). Размер круга соответствует количеству генов с изменяющейся экспрессией относительно общего количества генов в наборе. Результаты применения GSEA по коллекции С3 (Б, Б', Б''). НПО – нормализованный показатель обогащения. $FDR \leq 0.05$

обогащения по функциональной принадлежности с использованием коллекции С3 и наборов генов, содержащих последовательности для связывания с ТФ семейства IRF, STAT и NF-kB. Показано, что из всех наборов коллекции С3 (субколлекции TFT:TFT_LEGACY), содержащих гены, связывающие ТФ семейства IRF, были достоверно ($FDR \leq 0.05$) обогащены и имели положительные показатели обогащения (ПО) наборы генов

IRF_Q6 (ПО 0.46), STTTCRNTTT_IRF_Q6 (ПО 0.46), IRF1_Q6 (ПО 0.45) и IRF7_01 (ПО 0.45), что указывает на транскрипционную активность факторов IRF1 и IRF7. При исследовании наборов, содержащих гены с последовательностями для связывания ТФ семейства STAT, было обнаружено, что наборы генов STAT3_02 (ПО 0.48) и STAT6_02 (ПО 0.42) были достоверно ($FDR \leq 0.05$) обогащены и имели положительные ПО, что указывает на транскрипционную

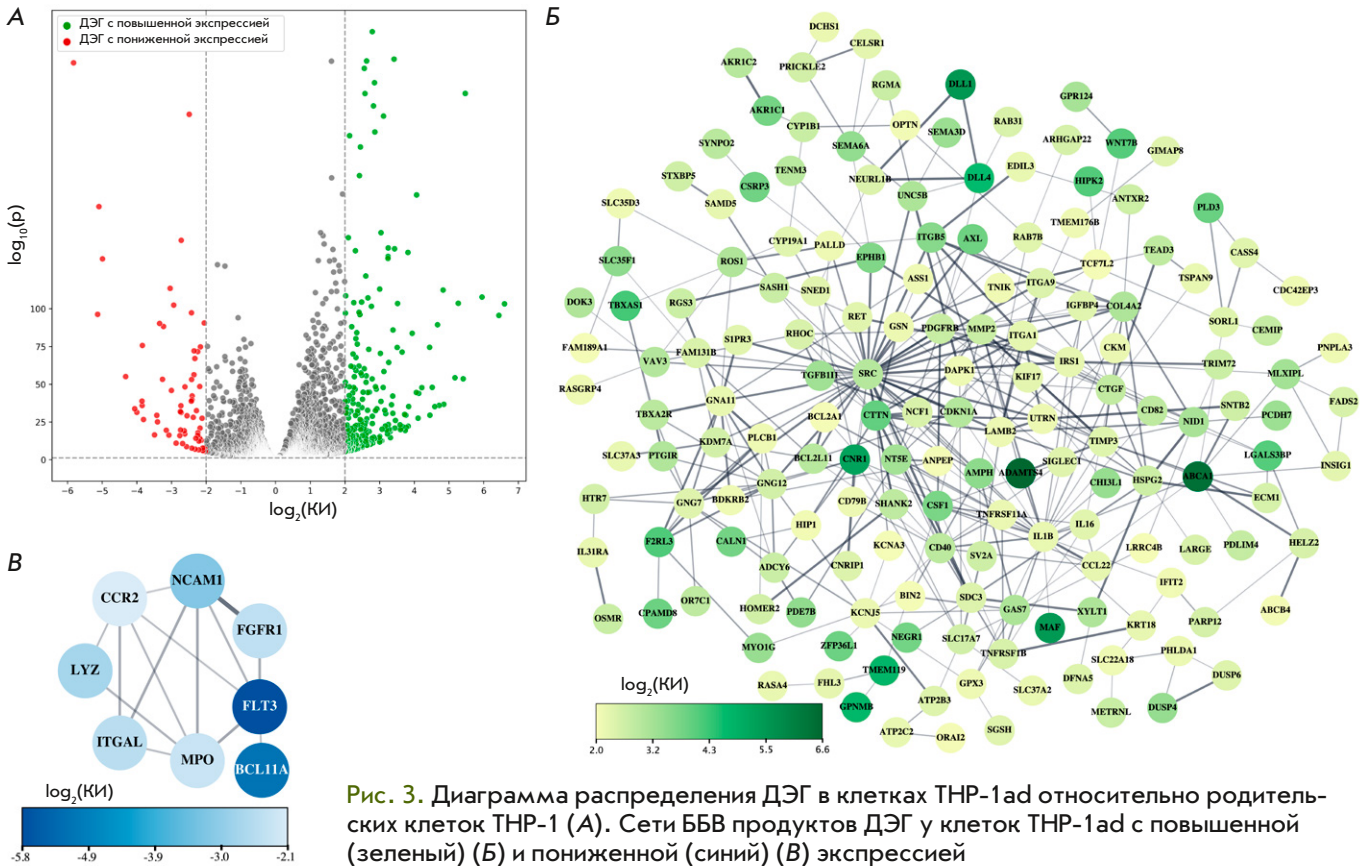


Рис. 3. Диаграмма распределения ДЭГ в клетках THP-1ad относительно родительских клеток THP-1 (A). Сети ББВ продуктов ДЭГ у клеток THP-1ad с повышенной (зеленый) (Б) и пониженной (синий) (В) экспрессией

активность факторов STAT3 и STAT6. Исследование наборов, содержащих гены с последовательностями, связывающими ТФ NF- κ B, показало, что наборы GGGNNTTTCC_NFKB_Q6_01, NFKB_Q6_01, NFKARPAВ_01, NFKB_Q6 и NFKARPAВ65_01 были достоверно ($FDR \leq 0.05$) обогащены и имели положительные показатели обогащения 0.524001, 0.485919, 0.477002, 0.458895 и 0.44804, соответственно, что указывает на выраженную NF- κ B-зависимую транскрипционную активность (рис. 2A–Г).

Известно, что регуляторные факторы интерферона IRF1 и IRF7 регулируют экспрессию интерферонов первого (α и β) и второго (γ) типов, выступающих в качестве индукторов воспаления при развитии опухолевых заболеваний [32–34]. Также известно, что ТФ STAT3 и STAT6 активируются при воспалении в опухолевом микроокружении, с активностью которых может быть связано усиление воспалительного ответа при прогрессии лейкозов [35–37]. Описана роль ТФ NF- κ B в формировании лейкозного микроокружения при стимуляции хронического воспаления в нише КМ под воздействием цитокина фактора некроза опухоли- α (ФНО α), что поддерживает благоприятную среду для выживания и продукции лейкозных клеток [38–40].

Таким образом, можно предположить, что в макрофагоподобных клонах THP-1ad конститутивно активны провоспалительные сигнальные пути, ассоциированные с ИФН α и ИФН γ , IL-6 и ФНО α . Также, полученные данные указывают на участие в реализации данных процессов ТФ IRF1, IRF7, STAT3, STAT6 и NF- κ B, известных модуляторов устойчивости опухолевых клеток.

Идентификация потенциальных генов-регуляторов TRAIL-резистентности макрофагоподобных клонов THP-1ad

С целью определения ДЭГ, продукты которых с наибольшей вероятностью могут выступать как регулирующие элементы идентифицируемых сигнальных путей в макрофагоподобных клонах THP-1ad из 21511 транскрибируемых генов, были отобраны 355 ДЭГ, соответствующих параметру $2 \leq \log_2(KI) \leq -2$. Идентификация отобранных ДЭГ показала повышенную экспрессию 286 генов и пониженную экспрессию 69 генов по сравнению с родительскими клетками THP-1 (рис. 3A).

Для идентификации взаимодействий между продуктами ДЭГ с помощью базы данных STRINGdb [41] были построены сети ББВ для ДЭГ с повышенной и пониженной экспрессией. Показано, что 167

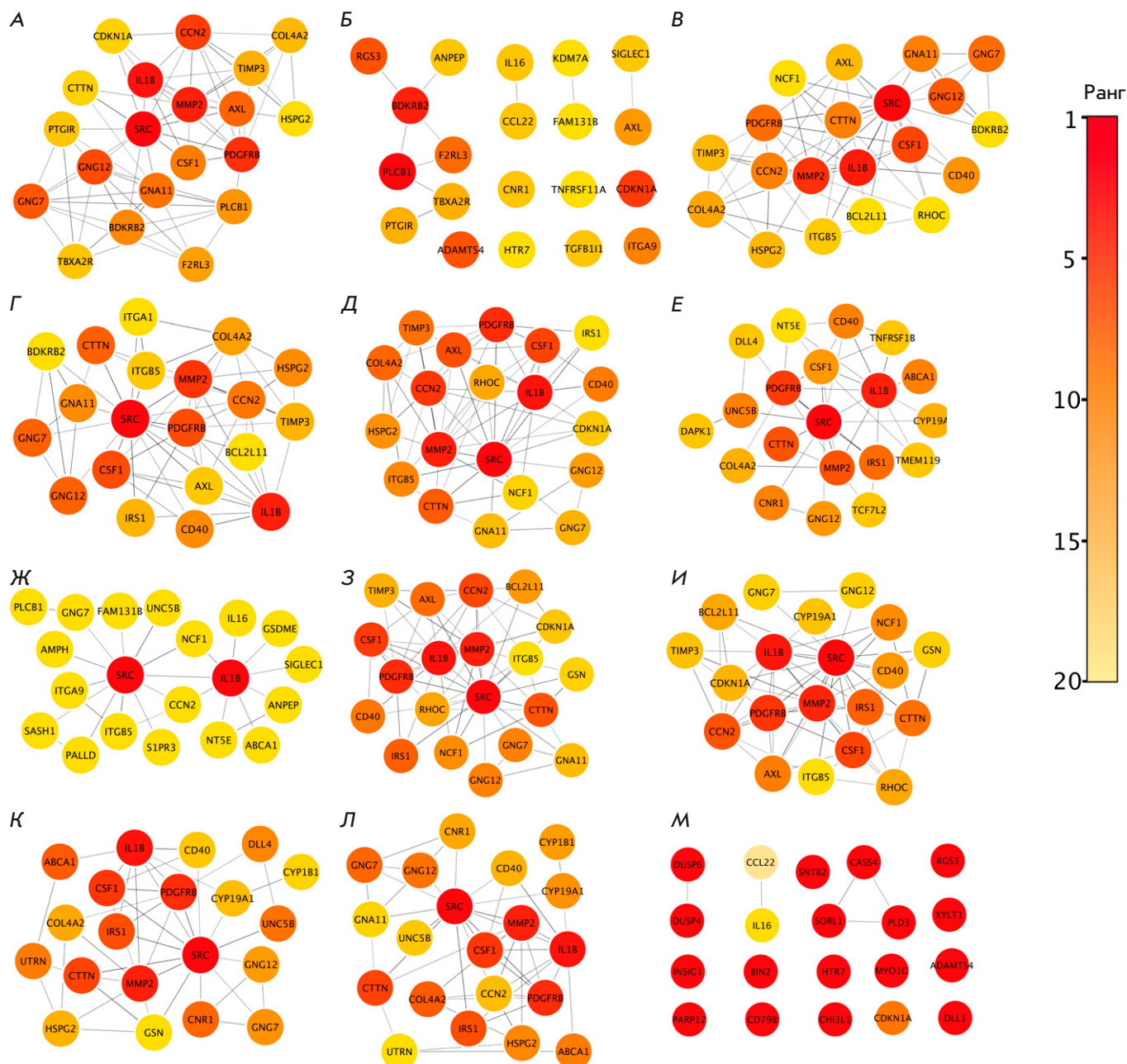


Рис. 4. Кластеризация сети ББВ генов с повышенной экспрессией с использованием алгоритмов модуля cytoHubba: MCC (А), DMNC (Б), MNC (В), Degree (Г), EPC (Д), BottleNeck (Е), EcCentricity (Ж), Closeness (З), Radiality (И), Betweenness (К), Stress (Л), ClusteringCoefficient (М)

из 286 генов с повышенной экспрессией образуют взаимосвязанную сеть (рис. 3Б), тогда как только 8 из 69 генов с пониженной экспрессией образуют взаимосвязанную сеть (рис. 3В).

Далее мы проводили анализ сети ББВ только для ДЭГ с повышенной экспрессией ввиду того, что она содержала больше взаимосвязанных участников, чем сеть ДЭГ с пониженной экспрессией, что потенциально может вносить более выражен-

ный вклад в формирование TRAIL-резистентности у макрофагоподобных клонов THP-1ad. Затем мы анализировали сеть ББВ для ДЭГ с повышенной экспрессией. Среди генов с повышенной экспрессией в сети ББВ была произведена кластеризация с использованием подключаемого к программному обеспечению Cytoscape модуля cytoHubba [23]. Кластеризация производилась с использованием 12 доступных алгоритмов cytoHubba для иденти-

фикации наиболее вероятных генов-концентраторов, которые потенциально могут вносить наибольший вклад в формирование сети БВВ и тем самым являться вероятными мишенями для снижения TRAIL-резистентности у макрофагоподобных клонов THP-1ad. С помощью алгоритмов cytoHubba были выделены 20 генов, которые имеют наибольшее значение ранга в анализируемой сети БВВ. Ранг в сети БВВ показывает степень «важности» данного гена, и чем выше ранг (чем ближе к нулю), тем более значимым для формирования сети считается данный ген (рис. 4).

В представленных на рис. 4 кластерах сети БВВ были выбраны пять наиболее повторяющихся генов с наибольшим значением ранга, такие, как: *CSF1*, который кодирует макрофагальный колониестимулирующий фактор (М-КСФ), *PDGFRB*, кодирующий рецептор тромбоцитарного фактора роста (ТФР), *MMP2*, кодирующий матриксную металлопротеиназу 2, *SRC*, кодирующий нерецепторную тирозинкиназу SRC, и *IL1B*, кодирующий интерлейкин 1β (IL-1β). Роль продуктов идентифицируемых генов-концентраторов хорошо известна как при миелоидном созревании и провоспалительной активации клеток, так и в прогрессии ОМЛ. Известно, что М-КСФ является не только основным регулятором дифференцировки макрофагов, но и перспективной мишенью для терапии ОМЛ [42, 43]. Показано участие рецептора ТФР в миелоидном созревании лейкозных клеток и в активации протоонкогенных тирозинкиназ семейства SRC, а также в поддержании жизнеспособности и пролиферации опухолевых клеток [44–46]. Тирозинкиназы SRC являются своеобразными сигнальными интеграторами, необходимыми как для нормального гемопоэза, так и для прогрессии острых лейкозов [47, 48]. Роль IL-1β как в развитии воспалительных процессов, так и при развитии злокачественных новообразований достаточно хорошо известна. Например, хроническое воспаление, опосредованное IL-1β, часто ассоциировано с возникновением и прогрессией злокачественных опухолей, а также с непосредственной регуляцией дифференцировки миелоидных клеток и сигнальных путей, опосредующих выживание лейкозных клеток [49–51]. В свою очередь, матриксные металлопротеиназы участвуют в миграции миелоидных клеток, индуцированной воспалением, а их подавление существенно снижает жизнеспособность и пролиферацию клеток ОМЛ [52, 53].

Таким образом, идентифицированы наиболее вероятные гены-регуляторы сигнальных путей, активированных в макрофагоподобных клонах THP-1ad, такие, как *CSF1*, *PDGFRB*, *MMP2*, *SRC* и *IL1B*. Продукты идентифицированных генов могут слу-

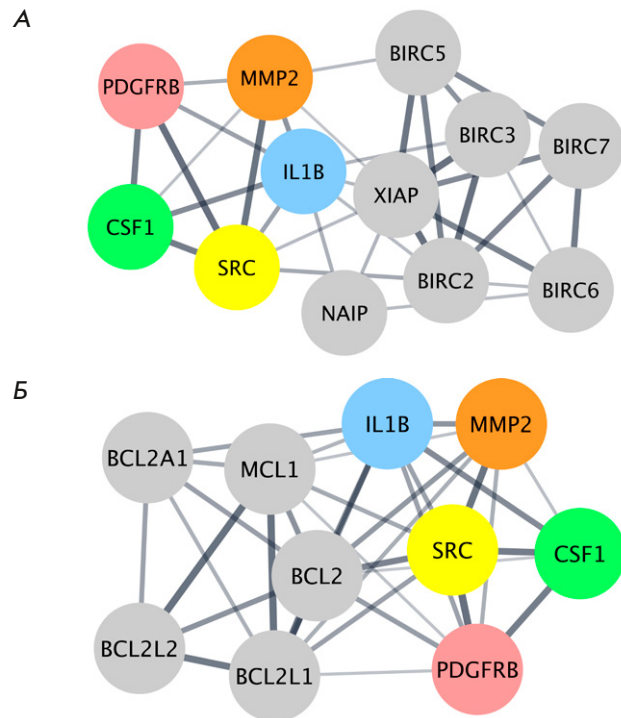


Рис. 5. Сети БВВ продуктов идентифицированных генов-концентраторов *IL1B*, *SRC*, *PDGFRB*, *MMP2* и *CSF1* с антиапоптотическими представителями семейств IAP (А) и BCL-2 (Б)

жить перспективными мишенями для подавления TRAIL-резистентности у макрофагоподобных клонов THP-1ad.

Исследование взаимодействия генов-концентраторов с представителями семейств IAP и BCL-2

Хорошо известно, что основными внутриклеточными позитивными регуляторами устойчивости клеток ОМЛ к TRAIL-индуцированному апоптозу являются представители семейств BCL-2 и IAP, блокирующие апоптоз как на уровне митохондрий, так и эффекторных каспаз [18, 54, 55]. Для определения потенциального взаимодействия идентифицированных генов-концентраторов с антиапоптотическими представителями семейств IAP и BCL-2 были построены сети БВВ.

Обнаружено, что среди пяти идентифицированных генов-концентраторов с представителями семейства IAP взаимодействуют только гены *MMP2* (партнеры *BIRC5* и *XIAP*), *IL1B* (партнеры *BIRC2*, *BIRC3*, *NAIP* и *XIAP*) и *SRC* (партнеры *BIRC2* и *XIAP*) (рис. 5А). В то же время с представителями семейства BCL-2 взаимодействуют все идентифицированные гены-концентраторы. Партнерами гена *IL1B* являются *BCL2*, *BCL2A1* и *MCL1*, партнера-

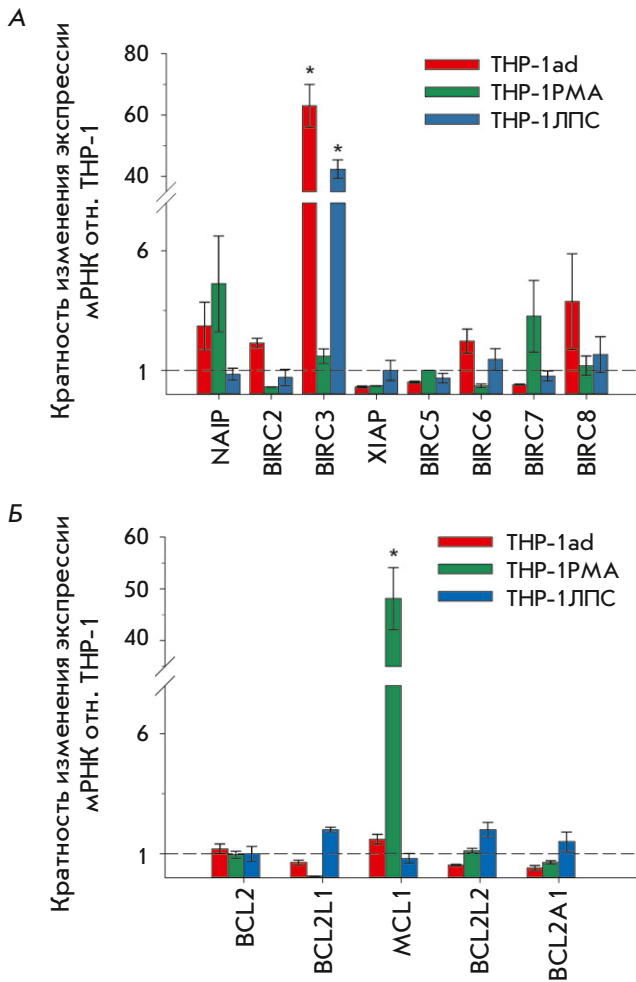


Рис. 6. Экспрессия генов семейства IAP (А) и BCL-2 (Б) в макрофагоподобных клонах THP-1ad, клетках THP-1PMA и THP-1ЛПС. Данные приведены в виде среднего значения \pm SD ($n \geq 5$). * $p \leq 0.05$ в сравнении с родительскими клетками THP-1

ми генов *SRC*, *PDGFRB* и *MMP2* выступают *BCL2*, *BCL2L1* и *MCL1*, а гена *CSF1* – *BCL2* (рис. 5Б). Таким образом, все идентифицированные гены-концентраторы могут взаимодействовать с антиапоптотическими представителями семейств IAP и BCL-2, что, в свою очередь, указывает на потенциальную возможность участия представителей данных семейств в механизме устойчивости макрофагоподобных клеток THP-1ad к TRAIL-индуцированной гибели.

Далее методом количественной ПЦР с обратной транскрипцией соотнесли экспрессию всех антиапоптотических членов семейства IAP и BCL-2 в макрофагоподобных клонах THP-1ad и в родительских клетках THP-1. Дополнительно экспрессию тех же генов оценили в клетках THP-1, обработанных фор-

боловым эфиром (THP-1PMA) и ЛПС (THP-1ЛПС), известными индукторами макрофагальной дифференцировки и активации провоспалительных сигнальных путей, соответственно [56, 57].

Показано, что в клетках THP-1ad достоверно ($p \leq 0.05$) увеличена (в 63 ± 7 раза) экспрессия только гена *BIRC3*, кодирующего белок cIAP2, – известный ингибитор каспаз 3, 7, 8 и 10 [58]. Схожие результаты получены для клеток THP-1ЛПС, где также достоверно ($p \leq 0.05$) увеличивалась (в 42 ± 3 раза) экспрессия только гена *BIRC3*. В клетках THP-1PMA достоверного увеличения экспрессии представителей семейства IAP не обнаружено (рис. 6А). Анализ экспрессии генов антиапоптоических белков семейства BCL-2 выявил достоверное ($p \leq 0.05$) увеличение (в 48 ± 6 раза) экспрессии гена *MCL1*, ингибитора проапоптоических белков Bax и Bak, только в клетках THP-1PMA (рис. 6Б) [59].

Таким образом, в макрофагоподобных клонах THP-1ad обнаружено характерное для провоспалительной активации увеличение экспрессии гена *BIRC3*, являющегося партнером гена-концентратора *IL1B*, что с наибольшей вероятностью указывает на ключевое участие данного гена-концентратора в повышении резистентности к TRAIL-индуцированной гибели.

Опубликованы данные об активации процессов воспаления в микроокружении костного мозга при ОМЛ [5, 6, 60] и о роли цитокина *IL1β* в прогрессии миелоидных лейкозов [51, 61, 62]. Кроме того, известно, что макрофагальная дифференцировка может сопровождаться повышением экспрессии белка cIAP2 [63]. Однако данные о возможном участии *IL-1β*-опосредованной провоспалительной активации в формировании устойчивости макрофагоподобных клеток ОМЛ к цитотоксическому TRAIL, потенциально реализуемой через повышение экспрессии *BIRC3*, получены нами впервые.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С помощью транскриптомного анализа макрофагоподобных TRAIL-резистентных клонов клеток ОМЛ THP-1ad, которые были получены в модельных условиях провоспалительного микроокружения лейкозных клеток, показана высокая конститутивная активность внутриклеточных провоспалительных сигнальных путей, ассоциированных с ИФН α и ИФН γ , *IL-6* и ФНО α . Также определены наиболее вероятные ТФ, такие, как *IRF1*, *IRF7*, *STAT3*, *STAT6* и *NF-kB*, потенциально определяющие активацию данных сигнальных путей. При поиске потенциальных регуляторов выявленных провоспалительных сигнальных путей были идентифицированы наиболее вероятные участники этих путей, такие,

как *CSF1*, *PDGFRB*, *MMP2*, *SRC* и *IL1B*. Также выявлено, что в клетках ТНР-1ad на фоне провоспалительной активации повышается экспрессия гена *BIRC3*, кодирующего cIAP2 – ингибитор эффекторных каспаз, что может опосредовать повышение устойчивости к цитотоксическому лиганду TRAIL. Важным результатом является обнаружение ключевого молекулярного участника – гена *IL1B*, потенциально связывающего процессы провоспалительной активации и формирования устойчивости к TRAIL

у макрофагоподобных клонов ТНР-1ad. Таким образом, мы полагаем, что механизм индукции формирования TRAIL-резистентности на фоне активации воспаления в макрофагоподобных клетках ОМЛ может заключаться в IL-1 β -ассоциированном, через NF-kB, повышении экспрессии ингибитора апоптоза cIAP2. ●

*Исследование выполнено в рамках
Государственного задания № 075-00224-24-01.*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Short N.J., Rytting M.E., Cortes J.E. // *The Lancet*. 2018. V. 392. № 10147. P. 593–606.
- Kantarjian H., Kadia T., DiNardo C., Daver N., Borthakur G., Jabbour E., Garcia-Manero G., Konopleva M., Ravandi F. // *Blood Cancer J*. 2021. V. 11. № 2. P. 41.
- Récher C. // *Front. Oncol*. 2021. V. 11. P. 623952.
- Cook E.K., Luo M., Rauh M.J. // *Exp. Hematol*. 2020. V. 83. P. 85–94.
- Zhong F.-M., Yao F.-Y., Liu J., Zhang H.-B., Li M.-Y., Jiang J.-Y., Xu Y.-M., Yang W.-M., Li S.-Q., Zhang J., et al. // *Biosci. Rep*. 2022. V. 42. № 5. P. BSR20220647.
- Ellegast J.M., Alexe G., Hamze A., Lin S., Uckelmann H.J., Rauch P.J., Pimkin M., Ross L.S., Dharia N.V., Robichaud A.L., et al. // *Cancer Discov*. 2022. V. 12. № 7. P. 1760–1781.
- Lasry A., Nadorp B., Fornerod M., Nicolet D., Wu H., Walker C.J., Sun Z., Witkowski M.T., Tikhonova A.N., Guillaumot-Ruano M., et al. // *Nat. Cancer*. 2022. V. 4. № 1. P. 27–42.
- Mysore V., Tahir S., Furuhashi K., Arora J., Rosetti F., Cullere X., Yazbeck P., Sekulic M., Lemieux M.E., Raychaudhuri S., et al. // *J. Exp. Med*. 2022. V. 219. № 5. P. e20210562.
- Hernandez G., Mills T.S., Rabe J.L., Chavez J.S., Kuldaneck S., Kirkpatrick G., Noetzi L., Jubair W.K., Zanche M., Myers J.R., et al. // *Haematologica*. 2020. V. 105. № 3. P. 585–597.
- Maltby S., Hansbro N.G., Tay H.L., Stewart J., Plank M., Donges B., Rosenberg H.F., Foster P.S. // *J. Immunol*. 2014. V. 193. № 8. P. 4072–4082.
- Yoyen-Ermis D., Tunali G., Tavukcuoglu E., Horzum U., Ozkazanc D., Sutlu T., Buyukasik Y., Esendagli G. // *Sci. Rep*. 2019. V. 9. № 1. P. 11697.
- Van Galen P., Hovestadt V., Wadsworth Ii M.H., Hughes T.K., Griffin G.K., Battaglia S., Verga J.A., Stephansky J., Pastika T.J., Lombardi Story J., et al. // *Cell*. 2019. V. 176. № 6. P. 1265–1281.e24.
- Bottomly D., Long N., Schultz A.R., Kurtz S.E., Tognon C.E., Johnson K., Abel M., Agarwal A., Avaylon S., Benton E., et al. // *Cancer Cell*. 2022. V. 40. № 8. P. 850–864.e9.
- Montinaro A., Walczak H. // *Cell Death Differ*. 2023. V. 30. № 2. P. 237–249.
- Artykov A.A., Yagolovich A.V., Dolgikh D.A., Kirpichnikov M.P., Trushina D.B., Gasparian M.E. // *Front. Cell Dev. Biol*. 2021. V. 9. P. 733688.
- Di Cristofano F., George A., Tajiknia V., Ghandali M., Wu L., Zhang Y., Srinivasan P., Strandberg J., Hahn M., Sanchez Sevilla Uruchurtu A., et al. // *Biochem. Soc. Trans*. 2023. V. 51. № 1. P. 57–70.
- Кобякова М.И., Евстратова Я.В., Сенотов А.С., Ломовский А.И., Минайчев В.В., Звягина А.И., Соловьева М.Е., Фадеева И.С., Акатов В.С., Фадеев Р.С. // *Биол. мембраны*. 2021. V. 38. № 1. P. 61–70.
- Kobyakova M., Lomovskaya Y., Senotov A., Lomovsky A., Minaychev V., Fadeeva I., Shtatnova D., Krasnov K., Zvyagina A., Odinokova I., et al. // *Int. J. Mol. Sci*. 2022. V. 23. № 14. P. 7881.
- Lomovskaya Y.V., Kobyakova M.I., Senotov A.S., Lomovsky A.I., Minaychev V.V., Fadeeva I.S., Shtatnova D.Y., Krasnov K.S., Zvyagina A.I., Akatov V.S., et al. // *Biomolecules*. 2022. V. 12. № 2. P. 150.
- Ломовская Я.В., Кобякова М.И., Сенотов А.С., Фадеева И.С., Ломовский А.И., Краснов К.С., Штатнова Д.Ю., Акатов В.С., Фадеев Р.С. // *Биол. мембраны*. 2022. V. 39. № 6. P. 457–473.
- Dijk M.V., Murphy E., Morrell R., Knapper S., O'Dwyer M., Samali A., Szegedzi E. // *Cancers*. 2011. V. 3. № 1. P. 1329–1350.
- Subramanian A., Tamayo P., Mootha V.K., Mukherjee S., Ebert B.L., Gillette M.A., Paulovich A., Pomeroy S.L., Golub T.R., Lander E.S., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2005. V. 102. № 43. P. 15545–15550.
- Chin C.-H., Chen S.-H., Wu H.-H., Ho C.-W., Ko M.-T., Lin C.-Y. // *BMC Syst. Biol*. 2014. V. 8. № S4. P. S11.
- Benjamini Y., Hochberg Y. // *J. R. Stat. Soc. Ser. B Methodol*. 1995. V. 57. № 1. P. 289–300.
- Liberzon A., Subramanian A., Pinchback R., Thorvaldsdóttir H., Tamayo P., Mesirov J.P. // *Bioinformatics*. 2011. V. 27. № 12. P. 1739–1740.
- Kopitar-Jerala N. // *Front. Immunol*. 2017. V. 8. P. 873.
- Hirano T. // *Int. Immunol*. 2021. V. 33. № 3. P. 127–148.
- Zelová H., Hošek J. // *Inflamm. Res*. 2013. V. 62. № 7. P. 641–651.
- Bae S., Park P.S.U., Lee Y., Mun S.H., Giannopoulou E., Fujii T., Lee K.P., Violante S.N., Cross J.R., Park-Min K.-H. // *Cell Rep*. 2021. V. 35. № 11. P. 109264.
- Liu L., Lu Y., Martinez J., Bi Y., Lian G., Wang T., Milasta S., Wang J., Yang M., Liu G., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2016. V. 113. № 6. P. 1564–1569.
- Lee H.Y., Cha J., Kim S.K., Park J.H., Song K.H., Kim P., Kim M.-Y. // *Mol. Cancer Res*. 2019. V. 17. № 2. P. 544–554.
- Qing F., Liu Z. // *Front. Immunol*. 2023. V. 14. P. 1190841.
- Holicek P., Truxova I., Rakova J., Salek C., Hensler M., Kovar M., Reinis M., Mikyskova R., Pasulka J., Vosahlikova S., et al. // *Cell Death Dis*. 2023. V. 14. № 3. P. 209.
- Provance O.K., Lewis-Wambi J. // *Breast Cancer Res*. 2019. V. 21. № 1. P. 59.
- Huang B., Lang X., Li X. // *Front. Oncol*. 2022. V. 12. P. 1023177.
- Delgado-Ramirez Y., Ocaña-Soriano A., Ledesma-Soto Y., Olguín J.E., Hernandez-Ruiz J., Terrazas L.I., Leon-Cabrera S. // *Int. J. Mol. Sci*. 2021. V. 22. № 8. P. 4049.

37. Karpathiou G., Papoudou-Bai A., Ferrand E., Dumollard J.M., Peoc'h M. // *Pathol. - Res. Pract.* 2021. V. 223. P. 153477.
38. Di Francesco B., Verzella D., Capece D., Vecchiotti D., Di Vito Nolfi M., Flati I., Cornice J., Di Padova M., Angelucci A., Alesse E., et al. // *Cancers.* 2022. V. 14. № 14. P. 3557.
39. Zhang T., Ma C., Zhang Z., Zhang H., Hu H. // *MedComm.* 2021. V. 2. № 4. P. 618–653.
40. Zhang S., Yang X., Wang L., Zhang C. // *Oncol. Lett.* 2018. V. 16. № 1. P. 679–686.
41. Szklarczyk D., Gable A.L., Lyon D., Junge A., Wyder S., Huerta-Cepas J., Simonovic M., Doncheva N.T., Morris J.H., Bork P., et al. // *Nucleic Acids Res.* 2019. V. 47. № D1. P. D607–D613.
42. Jones C.V., Ricardo S.D. // *Organogenesis.* 2013. V. 9. № 4. P. 249–260.
43. Sletta K.Y., Castells O., Gjertsen B.T. // *Front. Oncol.* 2021. V. 11. P. 654817.
44. Shah K., Vincent F. // *Mol. Biol. Cell.* 2005. V. 16. № 11. P. 5418–5432.
45. Reiterer G., Yen A. // *Cancer Res.* 2007. V. 67. № 16. P. 7765–7772.
46. Pandey P., Khan F., Upadhyay T.K., Seungjoon M., Park M.N., Kim B. // *Biomed. Pharmacother.* 2023. V. 161. P. 114491.
47. Voisset E., Brenet F., Lopez S., De Sepulveda P. // *Cancers.* 2020. V. 12. № 7. P. 1996.
48. Patel R.K., Weir M.C., Shen K., Snyder D., Cooper V.S., Smithgall T.E. // *PloS One.* 2019. V. 14. № 12. P. e0225887.
49. Mon N.N., Senga T., Ito S. // *Oncol. Lett.* 2017. V. 13. № 2. P. 955–960.
50. Liu S.T., Pham H., Pandol S.J., Ptaszniak A. // *Front. Physiol.* 2014. V. 4. P. 416.
51. Arranz L., Arriero M.D.M., Villatoro A. // *Blood Rev.* 2017. V. 31. № 5. P. 306–317.
52. Chou J., Chan M.F., Werb Z. // *Microbiol. Spectr.* 2016. V. 4. № 2. P. 4.2.18.
53. Pirillo C., Birch F., Tissot F.S., Anton S.G., Haltalli M., Tini V., Kong I., Piot C., Partridge B., Pospori C., et al. // *Blood Adv.* 2022. V. 6. № 10. P. 3126–3141.
54. Saraei R., Soleimani M., Movassaghpour Akbari A.A., Farshdousti Hagh M., Hassanzadeh A., Solali S. // *Biomed. Pharmacother.* 2018. V. 107. P. 1010–1019.
55. Hao X.-S., Hao J.-H., Liu F.-T., Newland A.C., Jia L. // *Apoptosis.* 2003. V. 8. № 6. P. 601–607.
56. Chanput W., Mes J.J., Wichers H.J. // *Int. Immunopharmacol.* 2014. V. 23. № 1. P. 37–45.
57. Page M.J., Kell D.B., Pretorius E. // *Chronic Stress.* 2022. V. 6. P. 247054702210763.
58. Mohamed M.S., Bishr M.K., Almutairi F.M., Ali A.G. // *Apoptosis.* 2017. V. 22. № 12. P. 1487–1509.
59. Sancho M., Leiva D., Lucendo E., Orzáez M. // *FEBS J.* 2022. V. 289. № 20. P. 6209–6234.
60. Lasry A., Nadorp B., Fornerod M., Nicolet D., Wu H., Walker C.J., Sun Z., Witkowski M.T., Tikhonova A.N., Guillaumot-Ruano M., et al. // *Nat. Cancer.* 2023. V. 4. № 1. P. 27–42.
61. Wang Y., Sun X., Yuan S., Hou S., Guo T., Chu Y., Pang T., Luo H.R., Yuan W., Wang X. // *Cytotherapy.* 2020. V. 22. № 3. P. 127–134.
62. Carey A., Edwards D.K., Eide C.A., Newell L., Traer E., Medeiros B.C., Pollyea D.A., Deininger M.W., Collins R.H., Tyner J.W., et al. // *Cell Rep.* 2017. V. 18. № 13. P. 3204–3218.
63. Morón-Calvente V., Romero-Pinedo S., Toribio-Castelló S., Plaza-Díaz J., Abadía-Molina A.C., Rojas-Barros D.I., Beug S.T., LaCasse E.C., MacKenzie A., Korneluk R., et al. // *PLoS One.* 2018. V. 13. № 3. P. e0193643.