

УДК 576.3

3D КО-КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА И НОРМАЛЬНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ КАК МОДЕЛЬ РЕКРУТИРОВАНИЯ ФИБРОБЛАСТОВ В ОПУХОЛЬ**О.А. Ракитина¹, Д.А. Дидыч¹, Н.И. Игнатова², Г.В. Шаронов², А.И. Кузьмич¹**¹ *Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия*² *НИИ экспериментальной онкологии и биомедицинских технологий ПИМУ, Нижний Новгород, Россия*

Опухолевая строма играет важную роль в формировании и развитии опухолей, а также может определять ответ опухоли на терапию. Одним из важных компонентов опухолевой стромы являются опухоль-ассоциированные фибробласты, или ОАФ. Эти клетки представляют собой рекрутированные в строму опухоли фибробласты, которые активируются раковыми клетками. В результате такой активации, фибробласты приобретают фенотип, характеризующийся пролиферацией, продукцией компонентов внеклеточного матрикса и его ремоделированием, а также выделением цитокинов и факторов роста, способствующих метастазированию опухоли. В связи с этим, взаимодействия раковых и стромальных клеток, в частности, ОАФ, сейчас активно изучаются, т.к. они могут стать перспективными прогностическими маркерами, а также мишенями противоопухолевой терапии [1,2]. Изучение взаимодействий раковых клеток и ОАФ *in vivo* может быть ограничено некоторыми факторами (низкое содержание ОАФ в опухоли; сложность выделения ОАФ из опухолей в связи с отсутствием генов-маркеров, однозначно определяющих ОАФ; расходы на содержание лабораторных животных и т.д.). В связи с этими ограничениями, разработка *in vitro* систем, моделирующих взаимодействие раковых клеток и ОАФ, является актуальной задачей. В данной работе было изучено, могут ли ко-культуры клеток колоректального рака и нормальных фибробластов кожи человека в трехмерном коллагеновом геле моделировать процесс рекрутирования фибробластов в опухоль, и зависят ли каким-то образом наблюдаемые фенотипические изменения от эпителиально-мезенхимальных свойств раковых клеток.

Для ко-культивации были выбраны две клеточные линии колоректального рака человека, с различным фенотипом – линия HT29 (эпителиальная [3]) и SW480 (мезенхимальная [3]). Фибробласты кожи (NF) метили флуоресцентным красителем CFMFA, после чего раковые клетки ко-культивировали с фибробластами кожи в трехмерном коллагеновом геле в течение 5 суток. Затем клетки извлекали из геля при помощи трипсина, окрашивали йодидом пропидия для дискриминации мертвых клеток, и разделяли раковые клетки и фибробласты с помощью FACS. В качестве контролей использовали культивированные в тех же условиях монокультуры раковых клеток и фибробластов. Из собранных популяций клеток выделяли РНК, которую подвергали RNA-seq анализу.

Анализ данных RNA-seq выявил, что при ко-культивации раковые клетки и фибробласты оказывают значительное влияние друг на друга. В раковых клетках HT29 в результате ко-культивации увеличивалась (более чем в 2 раза) экспрессия 2444 генов и уменьшалась (более чем в 2 раза) экспрессия 2702 генов. В раковых клетках SW480 в результате ко-культивации увеличивалась экспрессия 2652 генов и уменьшалась экспрессия 2171 генов. В NF из ко-культуры с HT29 в результате ко-культивации увеличивалась экспрессия 334 генов и уменьшалась экспрессия 135 генов. В NF из ко-культуры с SW480 в результате ко-культивации увеличивалась экспрессия 478 генов и уменьшалась экспрессия 219 генов. Функциональная аннотация ап-регулируемых генов на основе Gene Ontology Biological Processes позволила выявить, что в раковых клетках из обеих ко-культур существенно активируются процессы пролиферации и репарации ДНК, в то время как в фибробластах из обеих ко-культур активируются гены, связанные с ремоделированием внеклеточного матрикса, дифференцировкой мезенхимальных клеток, ответом на гипоксию и ранеобразованием.

Дополнительно мы оценили уровень экспрессии генов, определяющих эпителиально-мезенхимальные свойства клеток, с помощью EMT phenotype scoring, описанного в статье [4]. В качестве взвешивающих коэффициентов использовали коэффициенты, рассчитанные авторами [4] для колоректального рака. EMT phenotype scoring подтвердил существенно более эпителиальный фенотип HT29 по сравнению с SW480. При этом линия SW480 находится в промежуточном состоянии между HT29 и фибробластами кожи, т.е. она не до конца потеряла свои эпителиальные свойства. В результате ко-культивации существенных изменений экспрессии генов, определяющих эпителиально-мезенхимальные свойства клеток, обнаружено не было.

Кроме того, был оценен уровень экспрессии известных генов-маркеров ОАФ. Из 24 найденных в литературе маркеров [5–12], экспрессия 4 (ACTA2, DES, POSTN и TNC) активировалась в фибробластах при ко-культивации с раковыми клетками. При этом более эпителиальная линия HT29 активировала экспрессию маркеров ОАФ в фибробластах сильнее, чем более мезенхимальная линия SW480.

В ходе анализа изменений уровня экспрессии генов, связанных с синтезом и ремоделированием внеклеточного матрикса (ВМ), было обнаружено, что при ко-культивации в раковых клетках подавлялась экспрессия генов, связанных с катаболизмом ВМ, в то время как в фибробластах активировались гены, связанные с биосинтезом и ремоделированием ВМ.

Наблюдаемые изменения экспрессии генов в фибробластах, согласно [13], соответствуют процессам, происходящим при рекрутировании новых фибробластов в опухоль. К этим процессам относятся активация экспрессии некоторых генов-маркеров ОАФ и образование плотного ВМ.

Таким образом, при ко-культивации в такой модели раковые клетки и фибробласты оказывают значительное влияние друг на друга. Такая модель может использоваться для изучения молекулярных механизмов, опосредующих взаимодействие раковых клеток и рекрутированных фибробластов в опухолевом микроокружении. Кроме того, на таких моделях можно тестировать различные терапевтические подходы, нацеленные на разрушение взаимодействия раковых клеток и ОАФ.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 17–00–00194 (17–00–00190).

ЛИТЕРАТУРА

1. Sverdlov, E. Missed Druggable Cancer Hallmark: Cancer–Stroma Symbiotic Crosstalk as Paradigm and Hypothesis for Cancer Therapy. *BioEssays* 2018, 40.
2. Alekseenko, I.V.; Chernov, I.P.; Kostrov, S.V.; Sverdlov, E.D. Are synapse-like structures a possible way for crosstalk of cancer with its microenvironment? *Cancers (Basel)*. 2020, 12, 1–16, doi:10.3390/cancers12040806.
3. Liu, Y.; Li, Y.; Hou, R.; Shu, Z. Knockdown GREM1 suppresses cell growth, angiogenesis, and epithelial-mesenchymal transition in colon cancer. *J. Cell. Biochem.* 2019, 120, 5583–5596, doi:10.1002/jcb.27842.
4. Mak, M.P.; Tong, P.; Diao, L.; Cardnell, R.J.; Gibbons, D.L.; William, W.N.; Skoulidis, F.; Parra, E.R.; Rodriguez-Canales, J.; Wistuba, I.I.; et al. A Patient-Derived, Pan-Cancer EMT Signature Identifies Global Molecular Alterations and Immune Target Enrichment Following Epithelial-to-Mesenchymal Transition. *Clin. Cancer Res.* 2016, 22, 609–620, doi:10.1158/1078-0432.CCR-15-0876.
5. Orr, B.; Riddick, A.C.P.; Stewart, G.D.; Anderson, R.A.; Franco, O.E.; Hayward, S.W.; Thomson, A.A. Identification of stromally expressed molecules in the prostate by tag-profiling of cancer-associated fibroblasts, normal fibroblasts and fetal prostate. *Oncogene* 2012, 31, 1130–1142, doi:10.1038/onc.2011.312.
6. Shiga, K.; Hara, M.; Nagasaki, T.; Sato, T.; Takahashi, H.; Takeyama, H. Cancer-associated fibroblasts: Their characteristics and their roles in tumor growth. *Cancers (Basel)*. 2015, 7, 2443–2458.
7. Christodoulou, I.; Goulielmaki, M.; Devetzi, M.; Panagiotidis, M.; Koliakos, G.; Zoumpourlis, V. Mesenchymal stem cells in preclinical cancer cytototherapy: A systematic review. *Stem Cell Res. Ther.* 2018, 9, 1–38.
8. Fukagawa, D.; Sugai, T.; Osakabe, M.; Suga, Y.; Nagasawa, T.; Itamochi, H.; Sugiyama, T. Protein expression patterns in cancer-associated fibroblasts and cells undergoing the epithelial-mesenchymal transition in ovarian cancers. *Oncotarget* 2018, 9, 27514–27524, doi:10.18632/oncotarget.25518.
9. Su, S.; Chen, J.; Yao, H.; Liu, J.; Yu, S.; Lao, L.; Wang, M.; Luo, M.; Xing, Y.; Chen, F.; et al. CD10+GPR77+ Cancer-Associated Fibroblasts Promote Cancer Formation and Chemoresistance by Sustaining Cancer Stemness. *Cell* 2018, 172, 841–856.e16, doi:10.1016/j.cell.2018.01.009.
10. Yeo, S.Y.; Lee, K.W.; Shin, D.; An, S.; Cho, K.H.; Kim, S.H. A positive feedback loop bi-stably activates fibroblasts. *Nat. Commun.* 2018, 9, doi:10.1038/s41467-018-05274-6.
11. Wong, P.F.; Wei, W.; Gupta, S.; Smithy, J.W.; Zelterman, D.; Kluger, H.M.; Rimm, D.L. Multiplex quantitative analysis of cancer-associated fibroblasts and immunotherapy outcome in metastatic melanoma. *J. Immunother. Cancer* 2019, 7, 194, doi:10.1186/s40425-019-0675-0.
12. Curtis, M.; Kenny, H.A.; Ashcroft, B.; Mukherjee, A.; Johnson, A.; Zhang, Y.; Helou, Y.; Batlle, R.; Liu, X.; Gutierrez, N.; et al. Fibroblasts Mobilize Tumor Cell Glycogen to Promote Proliferation and Metastasis. *Cell Metab.* 2019, 29, 141–155.e9, doi:10.1016/j.cmet.2018.08.007.
13. Emon, B.; Bauer, J.; Jain, Y.; Jung, B.; Saif, T. Biophysics of Tumor Microenvironment and Cancer Metastasis – A Mini Review. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 2018, 16, 279–287.