

“БИПОЛЯРНОЕ” ДЕЙСТВИЕ ИНГИБИТОРА ВАСКУЛОГЕННОЙ МИМИКРИИ НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ В КЛЕТКАХ МЕЛАНОМЫ

© 2024 г. Н. А. Чуриков^{а, *}, А. А. Вартамян^б, Е. С. Клушевская^а, И. Р. Алембеков^а,
А. Н. Кретьова^а, В. Р. Чечеткин^а, Г. И. Кравацкая^а, В. С. Косоруков^б,
Ю. В. Кравацкий^а

^аИнститут молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

^бНациональный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, 115478 Россия

*e-mail: tchurikov@eimb.ru

Поступила в редакцию 01.09.2023 г.

После доработки 17.10.2023 г.

Принята к публикации 17.10.2023 г.

Внешние воздействия влияют на характер экспрессии генов с помощью разных, еще недостаточно изученных, механизмов. Мы использовали метод РНК-сек для изучения изменений в экспрессии генов в клетках меланомы, способных формировать васкулярные каналы, имитирующие кровоснабжение эмбриона (васкулогенная мимикрия), которые подвергаются обратному развитию вскоре после воздействия ингибитора васкулогенной мимикрии. С помощью анализа дифференциальной экспрессии генов обнаружено, что под воздействием ингибитора значительно усиливается экспрессия 50 генов, которые контролируют клеточный цикл и формирование цитоскелета. Одновременно 50 генов, регулирующих разные клеточные процессы, подвергаются значительной репрессии. Оказалось, что гены, экспрессия которых усиливается, регулируются одновременно в разной комбинации большим набором факторов транскрипции. В то же время репрессируемые гены одновременно регулируются другим набором факторов транскрипции. Таким образом, препарат вызывает изменения экспрессии больших групп генов, обусловленные одновременным воздействием множества факторов транскрипции. Полученные нами результаты указывают на то, что репрессия васкулогенной мимикрии в клетках меланомы сопровождается сайленсингом или активацией больших групп генов, вызванными действием множества факторов транскрипции.

Ключевые слова: координированная экспрессия генов, меланома, Матригель, ингибитор LCS1269, РНК-сек, факторы транскрипции, *ACER2*, *TCAF2*, *KIF18A*, *NAV3*, *FGF13*, *NCKAP5*

DOI: 10.31857/S0026898424020116, EDN: NIAKKQ

Механизмы регуляции экспрессии генов изучают не одно десятилетие, однако многое остается непонятным, особенно это относится к механизмам, которые обеспечивают координированную экспрессию генов. Предполагается, что совместная регуляция таких генов обусловлена тем, что они располагаются рядом, в одних и тех же хромосомных доменах [1, 2]. С другой

стороны, обеспечить одновременный сайленсинг многих генов, расположенных в разных хромосомах, можно с помощью молекул микроРНК (miРНК) или малых интерферирующих РНК (siРНК) [3–5]. Наряду с кровеносными сосудами, выстланными эндотелием, в опухолях представлены и высокоструктурированные васкулярные каналы, образованные опухолевыми клетками. В данной работе мы попытались выяснить, экспрессия каких генов изменяется в клетках высокоагрессивной меланомы, которые теряют способность к васкулогенной мимикрии под воздействием ингибитора LCS1269 [6, 7], и как эти гены регулируются. Васкулогенная мимикрия — это способность некоторых опухолевых клеток формировать ложные сосуды, не содержащие эндотелиальных клеток. По средством васкулогенной мимикрии в опухоли

Сокращения: РНК-сек — глубокое секвенирование РНК; LCS1269 — ингибитор васкулогенной мимикрии; ММ — эксперименты с клетками меланомы, растущими на Матригеле; ММ — эксперименты с клетками меланомы, растущими на Матригеле в присутствии ингибитора; ФТ — фактор транскрипции; FC — кратные изменения экспрессии (Fold Changes); GO.ID — идентификатор Онтологии Генов.

образуется сеть лакун, которые обеспечивают кровоснабжение опухолевых клеток и способствуют тем самым их выживанию [8].

Оказалось, что в присутствии ингибитора LCS1269 одновременно усиливается экспрессия 102 генов, тогда как 122 гена подвергаются репрессии. При этом экспрессия 50 генов каждой группы резко изменяется. Проведен анализ этих групп генов в базах онтологии генов, а также данных об их регуляции разными факторами транскрипции (ФТ). Наши данные свидетельствуют о том, что под воздействием ингибитора васкулогенной мимикрии в клетках меланомы происходит активация ФТ и изменяется экспрессия определенных групп генов. При этом до 10 разных ФТ могут регулировать экспрессию конкретного гена, а изменения экспрессии происходят в течение короткого промежутка времени.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Культивирование клеток меланомы. Клетки меланомы MelZ [6, 9] получены в Национальном медицинском исследовательском центре онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России. Клетки исходно растили на пластике в среде RPMI-1640, содержащей 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (“HyClone”, США), 2 mM глутамина, 0.1% гентамицина, в CO₂-инкубаторе (37 °C, влажность 95 и 5% CO₂) до 70–75% слияния (10 млн клеток). Затем клетки переносили на чашки с Матригелем (“BD Bioscience”, США) в той же среде, содержащей ингибитор васкулогенной мимикрии в нетоксической концентрации (LCS1269, 10⁻⁶ M), в которой он не влияет на пролиферацию клеток, или без ингибитора. Цитотоксичность ингибитора изучали с помощью MMT-теста, как описано ранее [6]. Рост клеток продолжался в течение 20 ч, затем из них выделяли препараты тотальной РНК.

Эксперименты РНК-сек. Проводили по два независимых эксперимента — с клетками, растущими без ингибитора или с ингибитором. Препараты РНК получали после лизиса клеток с помощью реагента Trisol (“Invitrogen”, США). Качество препаратов контролировали с помощью биоанализатора Agilent. Библиотеки кДНК готовили с помощью наборов реактивов TruSeq Stranded RNA. Глубокое секвенирование двух биологических реплик проводили на приборе HiSeq1500 (“Illumina”, США). Экспрессию генов анализировали с помощью пакета Deseq2 R. Консистентность реплик оценивали с помощью пакета deer Tools [10]. Коэффициенты Пирсона и Спирмана для наборов дан-

ных ММ ($r = 0.99$, $\rho = 0.69$) и ММІ ($r = 0.99$, $\rho = 0.67$) свидетельствуют о высокой воспроизводимости независимо полученных данных. Результаты РНК-сек помещены в базы данных (номера доступа для ММ — GSE221872; для ММІ — GSE221873).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Большие группы генов резко изменили уровень экспрессии в клетках меланомы в ответ на добавление ингибитора

Оказалось, что инкубация клеток в течение 20 ч с ингибитором приводит к повышению экспрессии 102 и снижению экспрессии 122 генов (при $\log_2\text{FC} > 1.5$, т. е. более чем в 2.83 раза). На рис. 1 приведено по 50 генов каждой группы с максимально изменившейся активностью. Цветная шкала приведена в широком диапазоне $\log_2\text{FC}$ — от +5.5 до -5.0. Ген *TMPO-AS1*, экспрессия которого максимально усилилась, кодирует длинную некодирующую РНК, он вовлечен в пролиферацию клеток опухолей разного типа и является онкогеном [11]. Экспрессия генов *ACER2* и *TCAF2* снизилась примерно в 32 раза ($\log_2\text{FC}$ около 5). Ген *TCAF2* вовлечен в позитивную регуляцию миграции клеток [12]. Эти данные позволяют предположить, что под действием ингибитора активируется пролиферация клеток и подавляется их миграция. Чтобы выяснить, в какие биологические процессы вовлечены гены, экспрессия которых изменилась, провели поиск в базах данных онтологии генов и выбрали по 50 генов с максимально изменившейся экспрессией.

Анализ генов с измененной экспрессией в базах данных онтологии генов

Биологические процессы, с которыми связаны гены меланомы, экспрессия которых изменилась в присутствии ингибитора LCS1269, мы анализировали с использованием ресурса Profiler (<https://biit.cs.ut.ee/gprofiler/gost>). В табл. 1 приведены результаты для 10 терминов онтологии генов, наиболее высоко ассоциированных с данными генами. Видно, что гены, экспрессия которых усилилась, ассоциированы с клеточным циклом и организацией цитоскелета. Гены *KIF18A*, *DLGAP5*, *KIF20A*, *PLK1*, *NAV3*, *FGF13* вовлечены в связывание с микротрубочками, а гены *KIF18A*, *NAV3*, *FGF13*, *NCKAP5* — в деполимеризацию микротрубочек. Гены *BUB1B*, *KIF18A*, *DLGAP5*, *STAG1*, *CCNE2*, *KIF20A*, *RBL1*, *XRCC2*, *TICRR*, *PLK1*, *DTL*, *E2F2*, *CDC25A*, *MYB* контролируют клеточный цикл.

Таблица 1. Молекулярные функции и биологические процессы, в которые вовлечены 50 генов, значительно усиливших экспрессию под действием ингибитора*

<i>GO.ID</i>	<i>Функция/Процесс</i>	<i>Padj</i>	<i>Ген</i>
<i>Молекулярная функция</i>			
GO:0008017	Microtubule binding	0.006829558415930034	<i>KIF18A, DLGAP5, KIF20A, PLK1, NAV3, FGF13</i>
GO:0015631	Tubulin binding	0.04453959825226614	<i>KIF18A, DLGAP5, KIF20A, PLK1, NAV3, FGF13</i>
<i>Биологический процесс</i>			
GO:0000278	Mitotic cell cycle	0.000002927752876054714	<i>BUB1B, KIF18A, DLGAP5, STAG1, CCNE2, KIF20A, RBL1, XRCC2, TICRR, PLK1, DTL, E2F2, CDC25A, MYB</i>
GO:1903047	Mitotic cell cycle process	0.00004046701434758872	<i>BUB1B, KIF18A, DLGAP5, STAG1, CCNE2, KIF20A, RBL1, TICRR, PLK1, DTL, E2F2, CDC25A</i>
GO:0022402	Cell cycle process	0.00018900471515918558	<i>BUB1B, KIF18A, DLGAP5, STAG1, CCNE2, KIF20A, RBL1, XRCC2, TICRR, PLK1, DTL, E2F2, CDC25A, WDR76</i>
GO:0044770	Cell cycle phase transition	0.00022746298342911283	<i>BUB1B, DLGAP5, CCNE2, RBL1, TICRR, PLK1, DTL, E2F2, CDC25A, WDR76</i>
GO:0007049	Cell cycle	0.00035945882615939285	<i>BUB1B, KIF18A, DLGAP5, STAG1, CCNE2, KIF20A, RBL1, XRCC2, TICRR, PLK1, DTL, E2F2, CDC25A, MYB, WDR76, UHRF1</i>
GO:0044772	Mitotic cell cycle phase transition	0.00045847139273843743	<i>BUB1B, DLGAP5, CCNE2, RBL1, TICRR, PLK1, DTL, E2F2, CDC25A</i>
GO:0006270	DNA replication initiation	0.001981323810320336	<i>CCNE2, MCM10, TICRR, PRIM1</i>
GO:0006260	DNA replication	0.0027829515300584542	<i>CCNE2, MCM10, TICRR, DTL, PRIM1, POLE2, FAM111B</i>
GO:1901987	Regulation of cell cycle phase transition	0.004055801393608912	<i>BUB1B, DLGAP5, RBL1, TICRR, PLK1, DTL, CDC25A, WDR76</i>
GO:0007019	Microtubule depolymerization	0.005597736302291347	<i>KIF18A, NAV3, FGF13, NCKAP5</i>

*Показаны только 10 процессов, максимально ассоциированных с 50 генами.

Таблица 2. Биологические процессы, в которые вовлечены 50 генов, экспрессия которых значительно снизилась под действием ингибитора*

<i>GO.ID</i>	<i>Биологический процесс</i>	<i>Padj</i>	<i>Ген</i>
GO:0043549	Regulation of kinase activity	0.0009631712673035452	<i>MRNIP, EPHB3, RGS2, SOCS1, EPHA2, SERTAD1, GADD45A, CCNG2, SESN2, CDKN1A</i>
GO:0048523	Negative regulation of cellular process	0.001747679364398328	<i>MRNIP, PTGER4, TRIM22, RGS2, SOCS1, ENC1, CAMSAP3, KANK3, EPHA2, BBC3, SERTAD1, GADD45A, SESN1, VASN, ARC, PRDM1, SESN2, TENT5C, TP53INP1, BTG2, CDKN1A, ACER2, TCAF2</i>
GO:0065009	Regulation of molecular function	0.001885574647728961	<i>MRNIP, TRIM22, EPHB3, RGS2, SOCS1, EPHA2, BBC3, XIRP1, SERTAD1, GADD45A, CCNG2, EDA2R, ARC, SESN2, CDKN1A, ACER2, TCAF2</i>
GO:0051338	Regulation of transferase activity	0.004627641665897807	<i>MRNIP, EPHB3, RGS2, SOCS1, EPHA2, SERTAD1, GADD45A, CCNG2, SESN2, CDKN1A</i>
GO:0048518	Positive regulation of biological process	0.02112371270600905	<i>KDM3A, MRNIP, PTGER4, TRIM22, EPHB3, RGS2, SOCS1, ENC1, EPHA2, TNFSF9, BBC3, SERTAD1, GADD45A, SESN1, EDA2R, ARC, PRDM1, SESN2, ACTA2, TENT5C, TP53INP1, BTG2, CDKN1A, ACER2, TCAF2</i>
GO:0009893	Positive regulation of metabolic process	0.024747078153625094	<i>KDM3A, MRNIP, PTGER4, TRIM22, EPHB3, SOCS1, EPHA2, BBC3, SERTAD1, GADD45A, SESN1, PRDM1, SESN2, ACTA2, TENT5C, TP53INP1, BTG2, CDKN1A, ACER2</i>
GO:0045859	Regulation of protein kinase activity	0.02510375699053	<i>MRNIP, RGS2, SOCS1, SERTAD1, GADD45A, CCNG2, SESN2, CDKN1A</i>
GO:0072331	Signal transduction by p53 class mediator	0.03283706367174577	<i>BBC3, EDA2R, SESN2, CDKN1A, ACER2</i>
GO:0042770	Signal transduction in response to DNA damage	0.04725086282309963	<i>MRNIP, GADD45A, SESN2, CDKN1A, ACER2</i>
GO:0033554	Cellular response to stress	0.04960437746562762	<i>MRNIP, PTGER4, EPHA2, BBC3, GADD45A, SESN1, VASN, EDA2R, SESN2, TP53INP1, BTG2, CDKN1A, ACER2</i>

*Приведены только 10 процессов, максимально ассоциированных с 50 генами.

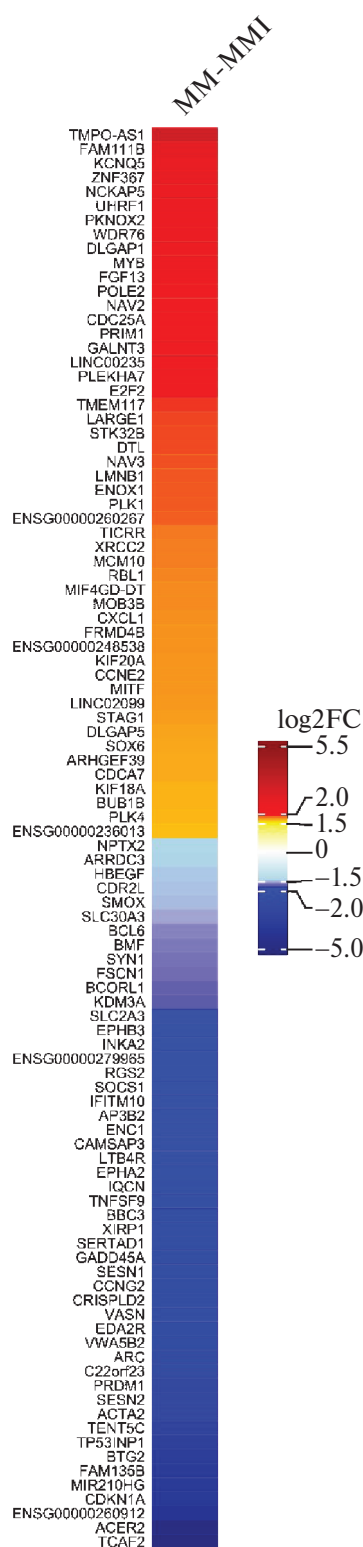


Рис. 1. Тепловая карта изменений экспрессии генов в клетках меланомы под действием ингибитора васкулогенной мимикрии. Отобрано по 50 генов, экспрессия которых максимально изменилась (повысилась либо снизилась) под действием ингибитора. Приведена цветная шкала изменений экспрессии

Представленные на рис. 1 гены, активность которых снизилась под действием ингибитора, связаны с положительной или отрицательной регуляцией ряда клеточных процессов (табл. 2). Приведенные в табл. 2 гены связаны с передачей клеточных сигналов медиаторами P53 (*BBC3*, *EDA2R*, *SESN2*, *CDKN1A*, *ACER2*), передачей сигналов о повреждениях ДНК (*MRNIP*, *GADD45A*, *SESN2*, *CDKN1A*, *ACER2*) и с клеточным ответом на стресс (*MRNIP*, *PTGER4*, *EPHA2*, *BBC3*, *GADD45A*, *SESN1*, *VASN*, *EDA2R*, *SESN2*, *TP53INP1*, *BTG2*, *CDKN1A*, *ACER2*).

В результате аналогичного анализа всех генов, экспрессия которых усилилась (102 гена) или снизилась (122 гена), сделан вывод, что под действием ингибитора усиливается моторная активность микротрубочек и миграция клеток меланомы. В то же время в этих клетках подавляется активность генов, которые регулируют пролиферацию и передают сигналы о клеточных стрессах.

Мы предположили, что одновременная активация или репрессия этих двух групп генов может быть связана с их корегуляцией, т. е. одна группа ФТ может одновременно усиливать экспрессию больших групп генов. Аналогично другая группа ФТ может одновременно ослаблять экспрессию больших групп генов.

Совместная регуляция генов многочисленными факторами транскрипции

Регулируются ли гены, активность которых резко изменилась в присутствии ингибитора, одновременно разными ФТ? Чтобы проверить такую возможность, мы провели поиск 50 генов, транскрипция которых усилилась, в базе данных Enrichr (<https://maayanlab.cloud/Enrichr/enrich>) для поиска ФТ, одновременно регулирующих эти гены (Enrichr Submissions TF-Gene Cooccurrence). На рис. 2а приведены результаты этого поиска. Оказалось, что действительно многие гены, транскрипция которых значительно усилилась в ответ на добавление ингибитора, регулируются одновременно 10 и более ФТ. В табл. 3 приведены только 10 ФТ и регулируемые ими гены. Видно, что в базе данных представлены всего 299 генов, которые регулируются таким образом. Среди рассмотренных 50 генов около 40 регулируются одновременно каждым из этих 10 ФТ.

в log2FC. 50 генам, экспрессия которых усилилась, соответствует критерий logFC > 1.71 (т. е., их экспрессия повысилась более чем в 3.27 раза). 50 генам, экспрессия которых снизилась, соответствует критерий log2FC < 1.89 (т. е. экспрессия снизилась более чем в 3.7 раза).

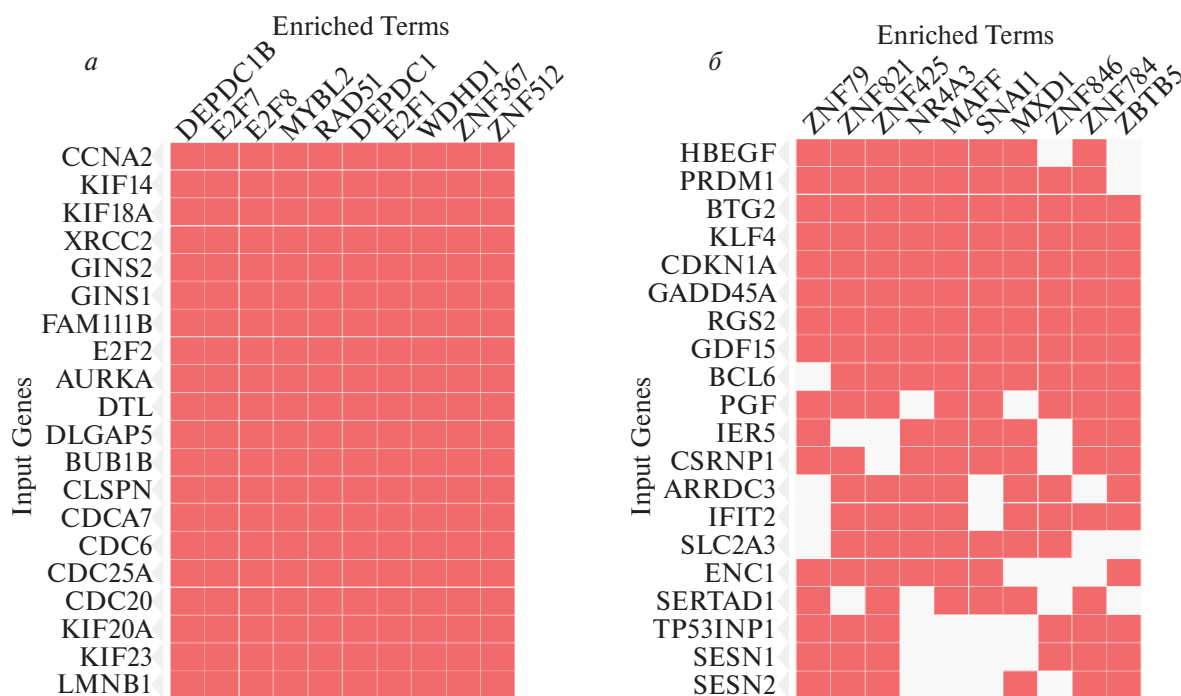


Рис. 2. Гены, экспрессия которых изменилась под воздействием ингибитора (Input Genes), регулируются одно- временно многими ФТ (Enriched Terms). *а* – Гены, экспрессия которых усилилась. *б* – Гены, экспрессия которых снизилась. Результаты получены с помощью базы данных Enrichr (<https://maayanlab.cloud/Enrichr/enrich>) для поиска ФТ, одновременно регулирующих гены (Enrichr Submissions TF-Gene Cooccurrence).

Ангиогенезу в меланоме способствует экспрессия гена *DEPDC1B*, кодирующего ФТ (табл. 3), нокдаун этого гена подавляет пролиферацию клеток меланомы и вызывает их апоптоз [13, 14], а также ФТ *MYBL2* – важный регулятор пролиферации клеток [15]. Кроме того, в табл. 3 указаны гены ФТ *E2F7* и *E2F8*, которые действуют синергично и важны для супрессии рака кожи [16]. Интересно, что экспрессия генов некоторых ФТ (*ZNF367*, *E2F1* и *DEPDC1*) возрастает под воздействием ингибитора васкулогенной мимикрии. Эти гены приведены не только в колонке ФТ, но и среди групп генов, активируемых под воздействием ингибитора васкулогенной мимикрии.

Анализ регуляции 50 генов со сниженной экспрессией показал, что примерно 20–30 из них в разных комбинациях регулируются 10 другими ФТ (табл. 4). Таким образом, ингибитор, подавляя образование ложных сосудов клетками меланомы, существенно изменяет характер экспрессии этих 50 генов с помощью множества ФТ.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные данные убедительно свидетельствуют о том, что ингибитор васкулогенной мимикрии вызывает изменения в экспрессии более чем 200 генов в клетках меланомы. Экспрессия 100 из них довольно значительно усиливается

или снижается (рис. 1). Предполагалось, что ингибитор *LCS1269* вызывает повреждения ДНК и арест G2/M перехода клеточного цикла, тем самым восстанавливая чувствительность клеток меланомы к ДНК-повреждающим агентам [6, 7, 9].

В настоящее время мы не можем выявить ключевые гены, ответственные за эффект ингибитора, однако нами идентифицированы 100 генов, экспрессия которых резко изменяется под действием ингибитора. Эти гены играют важную роль в клеточном цикле, пролиферации клеток, формировании цитоскелета, миграции клеток, а также выполняют другие функции в клетках. Обнаружено, что кодируемый геном *DEPDC1B* ФТ, вовлеченный в миграцию клеток и запуск Wnt-сигнального пути, регулирует 42 гена, значительно усиливших экспрессию под действием ингибитора (табл. 3).

Как показано ранее, васкулогенная мимикрия связана с ремоделированием цитоскелета и требует целостности сети микротрубочек [17]. Значительное усиление активности генов *KIF18A*, *NAV3*, *FGF13*, *NCKAP5* (табл. 1), которые вовлечены в деполимеризацию микротрубочек, свидетельствует о нарушениях цитоскелета, вызываемых ингибитором. Кроме того, ингибитор вызывает резкое подавление экспрессии генов *TCAF2* и *ACER2*, связанных с позитивной

Таблица 3. Факторы транскрипции (ФТ), одновременно регулирующие группы генов, активируемых после добавления ингибитора

Фактор транскрипции	Доля	<i>Padj</i>	Ген
DEPDC1B	42/299	3.580485614936991E-47	UHRF1;PRIM1;CDCA7;KIF14;BUB1B;MCM10;LMNB1;AURKA;CDC20;MYB;PCLAF;E2F1;E2F2;CLSPN;ZNF367;DLGAP5;PLK4;GINS1;GINS2;ATAD5;XRCC2;ARHGEF39;PLK1;KIF23;CDC6;WDR76;CDC25A;TICRR;FAM111B;CCNA2;MMS22L;ASPM;NEIL3;KIF18A;WEE1;RBL1;CCNE2;POLE2;DEPDC1;KIF20A;MCM6;DTL
E2F7	41/299	3.821023448908531E-46	UHRF1;PRIM1;CDCA7;KIF14;BUB1B;MCM10;LMNB1;AURKA;CDC20;MYB;PCLAF;E2F1;E2F2;CLSPN;ZNF367;DLGAP5;PLK4;GINS1;GINS2;ATAD5;XRCC2;PLK1;KIF23;CDC6;WDR76;CDC25A;TICRR;FAM111B;CCNA2;MMS22L;ASPM;NEIL3;KIF18A;WEE1;RBL1;CCNE2;POLE2;DEPDC1;KIF20A;MCM6;DTL
E2F8	41/299	3.821023448908531E-46	UHRF1;PRIM1;CDCA7;KIF14;BUB1B;MCM10;LMNB1;AURKA;CDC20;MYB;PCLAF;E2F1;E2F2;CLSPN;ZNF367;DLGAP5;PLK4;GINS1;GINS2;ATAD5;XRCC2;PLK1;KIF23;CDC6;WDR76;CDC25A;TICRR;FAM111B;CCNA2;MMS22L;ASPM;NEIL3;KIF18A;WEE1;RBL1;CCNE2;POLE2;DEPDC1;KIF20A;MCM6;DTL
MYBL2	41/299	3.821023448908531E-46	UHRF1;PRIM1;CDCA7;KIF14;BUB1B;MCM10;LMNB1;AURKA;CDC20;MYB;PCLAF;E2F1;E2F2;CLSPN;ZNF367;DLGAP5;PLK4;GINS1;GINS2;ATAD5;XRCC2;PLK1;KIF23;CDC6;WDR76;CDC25A;TICRR;FAM111B;CCNA2;MMS22L;ASPM;NEIL3;KIF18A;WEE1;RBL1;CCNE2;POLE2;DEPDC1;KIF20A;MCM6;DTL
RAD51	41/299	3.821023448908531E-46	UHRF1;PRIM1;CDCA7;KIF14;BUB1B;MCM10;LMNB1;AURKA;CDC20;MYB;PCLAF;E2F1;E2F2;CLSPN;ZNF367;DLGAP5;PLK4;GINS1;GINS2;ATAD5;XRCC2;PLK1;KIF23;CDC6;WDR76;CDC25A;TICRR;FAM111B;CCNA2;MMS22L;ASPM;NEIL3;KIF18A;WEE1;RBL1;CCNE2;POLE2;DEPDC1;KIF20A;MCM6;DTL
DEPDC1	40/299	9.750383314399901E-45	UHRF1;PRIM1;CDCA7;KIF14;BUB1B;MCM10;LMNB1;AURKA;CDC20;PCLAF;E2F1;E2F2;CLSPN;ZNF367;DLGAP5;PLK4;GINS1;GINS2;ATAD5;XRCC2;ARHGEF39;PLK1;KIF23;CDC6;WDR76;CDC25A;TICRR;FAM111B;CCNA2;MMS22L;ASPM;NEIL3;KIF18A;WEE1;RBL1;CCNE2;POLE2;KIF20A;MCM6;DTL
E2F1	40/299	9.750383314399901E-45	UHRF1;PRIM1;CDCA7;KIF14;BUB1B;MCM10;LMNB1;AURKA;CDC20;MYB;PCLAF;E2F1;E2F2;CLSPN;ZNF367;DLGAP5;PLK4;GINS1;GINS2;ATAD5;XRCC2;PLK1;KIF23;CDC6;WDR76;CDC25A;TICRR;FAM111B;CCNA2;MMS22L;ASPM;NEIL3;KIF18A;WEE1;RBL1;CCNE2;POLE2;DEPDC1;KIF20A;MCM6;DTL
WDHD1	40/299	9.750383314399901E-45	UHRF1;PRIM1;CDCA7;KIF14;BUB1B;MCM10;LMNB1;AURKA;CDC20;PCLAF;E2F1;E2F2;CLSPN;ZNF367;DLGAP5;PLK4;GINS1;GINS2;ATAD5;XRCC2;PLK1;KIF23;CDC6;WDR76;CDC25A;TICRR;FAM111B;CCNA2;MMS22L;ASPM;NEIL3;KIF18A;WEE1;RBL1;CCNE2;POLE2;DEPDC1;KIF20A;MCM6;DTL
ZNF367	40/299	9.750383314399901E-45	UHRF1;PRIM1;CDCA7;KIF14;BUB1B;MCM10;LMNB1;AURKA;CDC20;MYB;PCLAF;E2F1;E2F2;CLSPN;DLGAP5;PLK4;GINS1;GINS2;ATAD5;XRCC2;PLK1;KIF23;CDC6;WDR76;CDC25A;TICRR;FAM111B;CCNA2;MMS22L;ASPM;NEIL3;KIF18A;WEE1;RBL1;CCNE2;POLE2;DEPDC1;KIF20A;MCM6;DTL
ZNF519	40/299	9.750383314399901E-45	UHRF1;PRIM1;CDCA7;KIF14;BUB1B;MCM10;LMNB1;AURKA;CDC20;MYB;PCLAF;E2F1;E2F2;CLSPN;ZNF367;DLGAP5;PLK4;GINS1;GINS2;ATAD5;XRCC2;PLK1;KIF23;CDC6;WDR76;CDC25A;TICRR;FAM111B;CCNA2;MMS22L;ASPM;NEIL3;KIF18A;WEE1;CCNE2;POLE2;DEPDC1;KIF20A;MCM6;DTL

Примечание. Представлены 10 ФТ. Доля – число генов, ассоциированных с данным ФТ, в выборке из 299 генов. Результаты анализа базы данных Enrichr (<https://maayanlab.cloud/Enrichr/enrichr>) для поиска ФТ, одновременно регулирующих гены (Enrichr Submissions TF-Gene Cooccurrence).

Таблица 4. Факторы транскрипции (ФТ), одновременно регулирующие группы генов, экспрессия которых снизилась после добавления ингибитора

Фактор транскрипции	Доля	<i>Padj</i>	Ген
ZNF79	31/299	2.3420335820357761E-26	<i>PTGER4;CSRNPI;BTG2;CDKN1A;NOTCH1;PRDM1;PPM1D;BBC3;RGS2;SERTAD1;SESN1;SESN2;ENC1;TP53INP1;FDXR;IER5;TRIM22;POLH;GADD45A;GDF15;SLC30A1;KLF4;PGF;PNRC1;ACER2;ACTA2;MDM2;PLXNB2;TNFSF9;EPHA2;HBEGF</i>
ZNF821	26/299	6.532976510709839E-20	<i>CSRNPI;BTG2;CDKN1A;SLC2A3;PRDM1;IFIT2;BBC3;FAM117A;RGS2;SESN1;SESN2;ENC1;TP53INP1;BMF;GADD45A;SMOX;GDF15;ARRDC3;KLF4;PGF;SBK1;BCL6;CCNG2;FSCN1;PLXNB2;HBEGF</i>
ZNF425	24/299	1.5281770047316118E-17	<i>BTG2;CDKN1A;GADD45A;GDF15;ARRDC3;SLC2A3;PRDM1;KLF4;PGF;PNRC1;IFIT2;RND1;BBC3;IQCN;RGS2;BCL6;SERTAD1;SESN1;CCNG2;SESN2;ENC1;TP53INP1;BMF;HBEGF</i>
NR4A3	23/299	1.9800969612121248E-16	<i>PTGER4;CSRNPI;BTG2;CDKN1A;GADD45A;GDF15;ARRDC3;SLC2A3;PRDM1;KLF4;CLU;IFIT2;ACTA2;RGS2;ARC;SOCS1;BCL6;CRISPLD2;ENC1;FSCN1;IER5;EPHA2;HBEGF</i>
MAFF	22/299	2.156404175382678E-15	<i>PTGER4;CSRNPI;BTG2;CDKN1A;GADD45A;GDF15;ARRDC3;SLC2A3;PRDM1;KLF4;CLU;PGF;PNRC1;IFIT2;RGS2;ARC;BCL6;SERTAD1;ENC1;IER5;EPHA2;HBEGF</i>
SNAI1	22/299	2.156404175382678E-15	<i>CSRNPI;BTG2;CDKN1A;NOTCH1;GADD45A;GDF15;SLC2A3;PRDM1;KLF4;PGF;RND1;ACTA2;RGS2;SOCS1;BCL6;SERTAD1;CRISPLD2;ENC1;FSCN1;IER5;EPHA2;HBEGF</i>
ATF3	21/299	1.4250083219969755E-14	<i>PTGER4;CSRNPI;BTG2;CDKN1A;GADD45A;GDF15;ARRDC3;SLC2A3;PRDM1;KLF4;CLU;IFIT2;ACTA2;RGS2;ARC;BCL6;SERTAD1;SESN2;IER5;EPHA2;HBEGF</i>
FOSB	21/299	1.4250083219969755E-14	<i>PTGER4;CSRNPI;BTG2;CDKN1A;GADD45A;GDF15;ARRDC3;SLC2A3;KLF4;CLU;IFIT2;ACTA2;RGS2;ARC;BCL6;SERTAD1;CRISPLD2;ENC1;IER5;EPHA2;HBEGF</i>
JDP2	21/299	1.4250083219969755E-14	<i>PTGER4;CSRNPI;BTG2;CDKN1A;NOTCH1;GADD45A;GDF15;SLC2A3;PRDM1;KLF4;CLU;IFIT2;RGS2;BCL6;CRISPLD2;SESN2;ENC1;FSCN1;IER5;EPHA2;HBEGF</i>
MXD1	21/299	1.4250083219969755E-14	<i>CSRNPI;BTG2;CDKN1A;GADD45A;SMOX;GDF15;ARRDC3;SLC2A3;PRDM1;KLF4;PNRC1;IFIT2;HELZ2;RGS2;SOCS1;BCL6;SERTAD1;CCNG2;SESN2;IER5;HBEGF</i>

Примечание. Представлены 10 ФТ. Указано число генов, ассоциированных с данным ФТ, в выборке из 299 генов, депонированных в базе данных (Доля). Результаты получены с помощью базы данных Enrichr (<https://maayanlab.cloud/Enrichr/enrich>) для поиска ФТ, одновременно регулирующих гены (Enrichr Submissions TF-Gene Cooccurrence).

регуляцией миграции клеток и пролиферации (рис. 1). Известно, что миграция клеток связана с малигнизацией и метастазированием [18]. Следовательно, активация генов *KIF18A*, *NAV3*, *FGF13*, *NCKAP5*, нарушающих целостность цитоскелета, и одновременная репрессия генов *TCAF2* и *ACER2*, которые теперь не могут усиливать миграцию и пролиферацию, способны

потенцировать эффект подавления васкулогенной мимикрии ингибитором (рис. 3). В настоящее время мы планируем использовать искусственное выключение активности генов *TCAF2* и *ACER2*, чтобы ослабить малигнизацию клеток меланомы за счет подавления миграции и метастазирования. Указанные гены могут быть мишенями для онкотерапии.

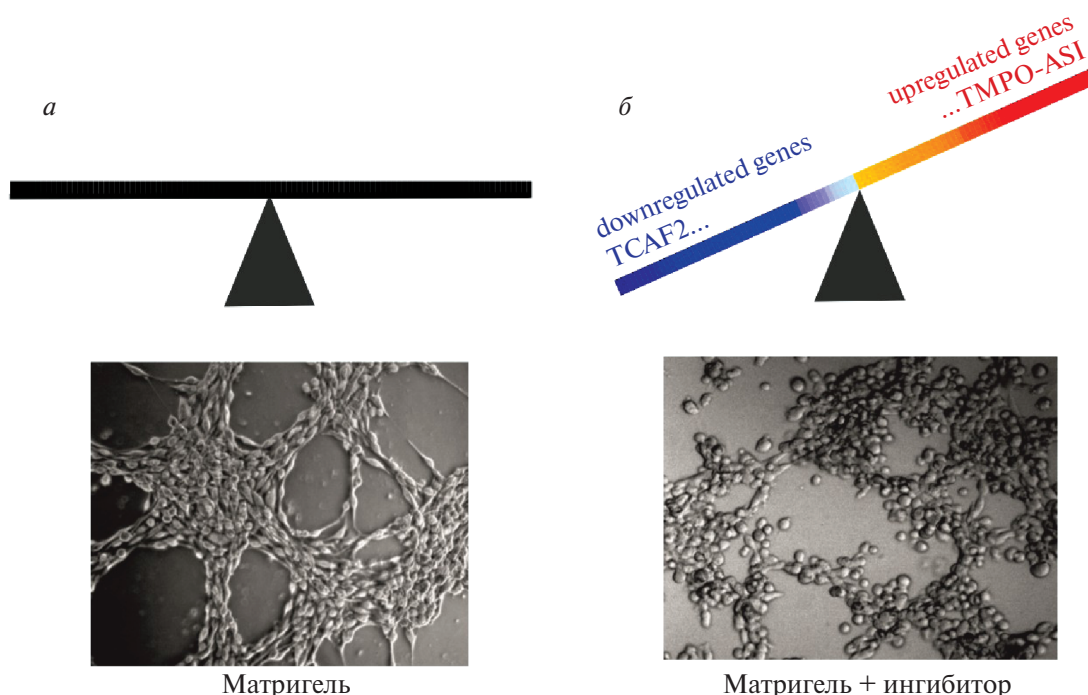


Рис. 3. Схема, показывающая, как добавление ингибитора нарушает баланс генной экспрессии и как это сказывается на фенотипе клеток меланомы. *a* — Баланс экспрессии генов до добавления ингибитора. Клетки веретеновидной формы на Матригеле формируют сосудоподобные структуры. *б* — Нарушение баланса экспрессии генов вызывает изменение поведения клеток (нарушается образование сосудоподобных структур) и их формы (клетки более округлые).

Ранее обнаружили, что ингибитор LCS1269 повреждает ДНК [6, 7, 9]. Нами показано, что ингибитор подавляет активность генов, которые связаны с передачей сигналов медиаторами P53 и сигналов о повреждениях ДНК (табл. 2), делая клетки меланомы более чувствительными к ДНК-повреждающим агентам. Таким образом, наши данные согласуются с ранее определенными свойствами ингибитора.

Другой важный аспект данной работы состоит в обнаружении механизма координированной экспрессии генов с помощью одновременной регуляции десятков генов наборами из десятков ФТ. Интересно, что при этом одни наборы ФТ вызывают активацию одних групп генов, тогда как другие в это же время вызывают репрессию других групп генов (табл. 3, табл. 4, рис. 3). Такая биполярная регуляция способна вызывать резкие изменения в экспрессии генов. Недавно мы обнаружили, что наборы таких генов-мишеней ФТ далеко не случайно перекрываются с генами, которые образуют контакты с ядрышками (данные будут опубликованы отдельно).

Одновременная экспрессия больших перекрывающихся наборов генов (коэкспрессия) — это недавно обнаруженный механизм регуляции генной активности. Во всех изученных клетках человека (ткани или культуры клеток) найде-

ны гены, которые коэкспрессируются в разных комбинациях [19]. В клетках линии K562, например, в разных комбинациях коэкспрессируются 177 наборов генов [20]. Удобной клеточной моделью для анализа механизмов регуляции экспрессии генов, включая роль трехмерных структур хромосом в изменениях экспрессии генов, является также меланома.

Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (грант № 21-14-00035) и Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (грант № 075-15-2021-1060).

В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kosak S.T., Scalzo D., Alworth S.V., Li F., Palmer S., Enver T., Lee J.S., Groudine M. (2007) Coordinate gene regulation during hematopoiesis is related to genomic organization. *PLoS Biol.* 5(11), e309. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050309>
2. Tchurikov N.A., Fedoseeva D.M., Sosin D.V., Snezhkina A.V., Melnikova N.V., Kudryavtseva A.V.,

- Kravatsky Y.V., Kretova O.V. (2015) Hot spots of DNA double-strand breaks and genomic contacts of human rDNA units are involved in epigenetic regulation. *J. Mol. Cell. Biol.* **7**, 366–382. doi: 10.1093/jmcb/mju038
3. Xu P., Wu Q., Yu J., Rao Y., Kou Z., Fang G., Shi X., Liu W., Han H. (2020) A systematic way to infer the regulation relations of miRNAs on target genes and critical miRNAs in cancers. *Front. Genet.* **11**, 278. doi: 10.3389/fgene.2020.00278
4. Tchurikov N.A., Kretova O.V. (2007) Suffix-specific RNAi leads to silencing of F element in *Drosophila melanogaster*. *PLoS One.* **2**(5), e476. doi: 10.1371/journal.pone.0000476
5. Bartel D.P. (2018) Metazoan microRNAs. *Cell.* **173**, 20–51. doi: 10.1016/j.cell.2018.03.006
6. Vartanian A., Baryshnikova M., Burova O., Afanasyeva D., Misyurin V., Belyavsky A., Shprakh Z. (2017) Inhibitor of vasculogenic mimicry restores sensitivity of resistant melanoma cells to DNA-damaging agents. *Melanoma Res.* **27**, 8–16. doi: 10.1097/CMR.0000000000000308
7. Kalitin N.N., Ektova L.V., Kostitsa N.S., Sivirina A.S., Kostarev A.V., Smirnova G.B., Borisova Y.A., Golubeva I.S., Ermolaeva E.V., Vergun M.A., Babaeva M.A., Lushnikova A.A., Karamysheva A.F. (2022) A novel glycosylated indolocarbazole derivative LCS1269 effectively inhibits growth of human cancer cells *in vitro* and *in vivo* through driving of both apoptosis and senescence by inducing of DNA damage and modulating of AKT/mTOR/S6K and ERK pathways. *Chem. Biol. Interact.* **364**, 10056. doi: 10.1016/j.cbi.2022.110056
8. Maniotis A.J., Folberg R., Hess A., Seftor E.A., Gardner L.M., Pe'er J., Trent J.M., Meltzer P.S., Hendrix M.J. (1999) Vascular channel formation by human melanoma cells *in vivo* and *in vitro*: vasculogenic mimicry. *Am. J. Pathol.* **155**(3), 739–752. doi: 10.1016/S0002-9440(10)65173-5
9. Вартанян А., Хоченкова Ю., Кособокова Е., Барышникова М., Косоруков В. (2021) СД437 снижает метастатический потенциал клеток меланомы. *Вестн. Моск. Ун-та. Сер. 2. Химия.* **62**(4), 333–340.
10. Ramirez F., Ryan D.P., Gruning B., Bhardwaj V., Kilpert F., Richter A.S., Heyne S., Dundar F., Manke T. (2016) deepTools2: a next generation web server for deep-sequencing data analysis. *Nucl. Acids Res.* **44**, W160–165.
11. Cui H., Zhao J. (2020) LncRNA TMPO-AS1 serves as a ceRNA to promote osteosarcoma tumorigenesis by regulating miR-199a-5p/WNT7B axis. *J. Cell Biochem.* **121**, 2284–2293. doi:10.1002/jcb.2945110
12. Gkika D., Lemonnier L., Shapovalov G., Gordienko D., Poux C., Bernardini M., Bokhobza A., Bidaux G., Degerny C., Verreman K., Guarmit B., Benahmed M., de Launoit Y., Bindels R.J., Fiorio Pla A., Prevarskaya N. (2015) TRP channel-associated factors are a novel protein family that regulates TRPM8 trafficking and activity. *J. Cell Biol.* **208**, 89–107. https://doi:10.1083/jcb.201402076
13. Hu F., Fong K.O., Cheung M.P.L., Liu J.A., Liang R., Li T.W., Sharma R., Ip P.P., Yang X., Cheung M. (2022) DEPDC1B promotes melanoma angiogenesis and metastasis through sequestration of ubiquitin ligase CDC16 to stabilize secreted SCUBE3. *Adv. Sci.* **9**, 2105226. https://doi.org/10.1002/advs.202105226
14. Xu Y., Sun W., Zheng B., Liu X., Luo Z., Kong Y., Xu M., Chen Y. (2019) DEPDC1B knockdown inhibits the development of malignant melanoma through suppressing cell proliferation and inducing cell apoptosis. *Exp. Cell. Res.* **379**(1), 48–54. doi: 10.1016/j.yexcr.2019.03.021
15. Musa J., Aynaud M.M., Mirabeau O., Delattre O., Grünwald T.G. (2017) MYBL2 (B-Myb): a central regulator of cell proliferation, cell survival and differentiation involved in tumorigenesis. *Cell Death Dis.* **8**, e2895 (2017). https://doi.org/10.1038/cddis.2017.244
16. Thurlings I., Martínez-López L., Westendorp B., Hien B.T., Martínez-López L.M., Zijp M., Thurlings I., Thomas R.E., Schulte-Merker S., Bakker W.J., de Bruin A. (2017) Synergistic functions of E2F7 and E2F8 are critical to suppress stress-induced skin cancer. *Oncogene.* **36**, 829–839. https://doi.org/10.1038/onc.2016.251
17. Vartanian A., Stepanova E., Grigorieva I., Solomko E., Belkin V., Baryshnikov A., Lichinitser M. (2011) Melanoma vasculogenic mimicry capillary-like structure formation depends on integrin and calcium signaling. *Microcirculation.* **18**, 390–399. doi: 10.1111/j.1549-8719.2011.00102.x
18. Bera K., Kiepas A., Godet I., Li Y., Mehta P., Ifemembi B., Paul C.D., Sen A., Serra S.A., Stoletov K., Tao J., Shatkin G., Lee S.J., Zhang Y., Boen A., Mistrionis P., Gilkes D.M., Lewis J.D., Fan C.M., Feinberg A.P., Valverde M.A., Sun S.X., Konstantopoulos K. (2022) Extracellular fluid viscosity enhances cell migration and cancer dissemination. *Nature.* **611**, 365–373. https://doi.org/10.1038/s41586-022-05394-6
19. Lachmann A., Torre D., Keenan A.B., Jagodnik K.M., Lee H.J., Wang L., Silverstein M.C., Ma'ayan A. (2018) Massive mining of publicly available RNA-seq data from human and mouse. *Nat. Commun.* **9**, 1366.
20. Tchurikov N.A., Klushevskaya E.S., Alembekov I.R., Kretova A.N., Chechetkin V.R., Kravatskaya G.I., Kravatsky Y.V. (2023) Induction of the erythroid differentiation of K562 Cells is coupled with changes in the inter-chromosomal contacts of rDNA clusters. *Int. J. Mol. Sci.* **24**(12), 9842. https://doi.org/10.3390/ijms24129842

Big groups of Human Genes are Simultaneously Regulated by Multiple Transcription Factors

N. A. Tchurikov^{1, *}, A. A. Vartanian², E. S. Klushevskaya¹, I. R. Alembekov¹,
A. N. Kretova¹, V. R. Chechetkin¹, G. I. Kravatskaya¹, V. S. Kosorukov², Yu. V. Kravatsky¹

¹*Engelhardt Institute of Molecular Biology Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia*

²*Department of Experimental Diagnosis and Therapy of Tumors, N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia, Moscow, 115478 Russia*

**e-mail: tchurikov@eimb.ru*

Multiple exogenous or endogenous factors alter gene expression patterns by different mechanisms that yet are poorly understood. We used RNA-Seq analysis in order to study changes in gene expression in melanoma cells capable to vasculogenic mimicry upon action of inhibitor of vasculogenic mimicry. Here, we describe that the drug induces a strong upregulation of 50 genes controlling cell cycle and microtubule cytoskeleton coupled with a strong downregulation of 50 genes controlling different cellular metabolic processes. We found that both groups of genes are simultaneously regulated by multiple sets of transcription factors. We conclude, that one way for coordinated regulation of big groups of genes is the regulation simultaneously by multiple transcription factors.

Keywords: coordinated expression, melanoma, Matrigel, LCS1269 inhibitor, RNA-Seq, transcription factors, *ACER2*, *TCAF2*, *KIF18A*, *NAV3*, *FGF13*, *NCKAP5*