

Изменение сигнализации p53 и экспрессии микроРНК при подавлении гена урокиназного рецептора в контексте химиорезистентности нейробластомы

Научный руководитель – Семина Екатерина Владимировна

Шмакова А.А.¹, Рысенкова К.Д.², Klimovich P.S.³

1 - Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Факультет фундаментальной медицины, Кафедра биологической и медицинской химии, Москва, Россия, *E-mail: anya.shmakova@list.ru*; 2 - Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Факультет фундаментальной медицины, Кафедра биологической и медицинской химии, Москва, Россия, *E-mail: Karina_ry@mail.ru*; 3 - Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Факультет фундаментальной медицины, Москва, Россия, *E-mail: lex2050@mail.ru*

Сериновая протеаза урокиназа uPA и ее рецептор uPAR - важные участники многих физиологических процессов, таких как фибринолиз, ремоделирование внеклеточного матрикса, заживление ран и регенерация [1]. С момента обнаружения высокой экспрессии uPA и ее рецептора uPAR в опухолях разного происхождения, активно изучается патогенетическая роль этих белков в регулировании процессов, характерных для опухолевой трансформации клеток. uPA/uPAR стимулируют инвазию и миграцию, активируют пролиферацию опухолевых клеток, индуцируют ангиогенез [2]. Нами было показано, что, с одной стороны, нокаут uPAR снижает пролиферацию клеток нейробластомы [3], однако, с другой стороны, в клетках без uPAR запускается эпителиально-мезенхимальный переход и возрастает миграция [4]. Известно, что эти процессы поддерживают метастазирование и химиорезистентность клеток опухоли, поэтому далее мы исследовали влияние нокаута uPAR на химиочувствительность клеток нейробластомы Neuro2a, а также исследовали молекулярные механизмы, опосредующие эти процессы.

В исследовании использовали различные клоны нейробластомы Neuro2a, в которых экспрессия гена урокиназного рецептора была подавлена с помощью системы CRISPR/Cas9n (Δ uPAR) [3]. При действии цисплатина в таких клетках уровень апоптоза, активации каспазы-3 и расщепления PARP1 был ниже, чем в клетках дикого типа (WT). Эти данные указывают на большую резистентность клеток Neuro2a Δ uPAR к действию цисплатина по сравнению с клетками с нормальным уровнем экспрессии uPAR. Изучая молекулярные механизмы данного эффекта, мы обнаружили, что в клетках Neuro2a Δ uPAR происходит накопление ключевого онкосупрессора p53, который, однако, является неактивным, т.к. при действии цисплатина его фосфорилирование по Ser15 существенно ниже, чем в клетках WT. Снижение активности p53 в клетках Neuro2a Δ uPAR подтверждается также уменьшением экспрессии его прямой мишени - белка p21, важного регулятора клеточного цикла и ответа на повреждения ДНК. Кроме того, мы изучили изменение профиля экспрессии микроРНК, происходящее в клетках Neuro2a Δ uPAR. Было идентифицировано 14 микроРНК, экспрессия которых изменилась минимум в 2 раза (13 снизилась, 1 повысилась). Среди сигнальных путей (по данным анализа в системе KEGG pathway), контролируемых генами-мишенями deregulированных микроРНК, были разные опухолевые процессы, а также клеточное старение (senescence). Как известно, сенесцентное состояние клетки с переходом в дормантное - один из механизмов избегания клеточной гибели при действии химиотерапии, и, как следствие, возникновения химиорезистентности [5]. В качестве возможного регулятора запуска данного состояния в клетках Neuro2a Δ uPAR нами было идентифицировано увеличение активности p38, характерное для сигналинга интегринов в отсутствие взаимодействия с uPAR и EGFR. Важно отметить, что роль uPAR в

процессах активации интегринов и EGFR в клетках нейробластомы Neuro2a мы доказали в наших исследованиях ранее [6,7].

Таким образом, падение экспрессии uPAR в клетках нейробластомы приводит к снижению чувствительности к противоопухолевой терапии, что может указывать на важную роль uPAR в возникновении dormantных опухолевых клеток, способных к метастазированию.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке РФФИ (№ 20-015-00186).

Источники и литература

- 1) R.K. Jaiswal, A.K. Varshney, P.K. Yadava, Diversity and functional evolution of the plasminogen activator system, *Biomed. Pharmacother.* 98 (2018) 886–898. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.01.029>.
- 2) A.H. Mekawy, M.H. Pourgholami, D.L. Morris, Involvement of Urokinase-Type Plasminogen Activator System in Cancer: An Overview, *Med. Res. Rev.* 34 (2014) 918–956. <https://doi.org/10.1002/med.21308>.
- 3) K.D. Rysenkova, E. V Semina, M.N. Karagyaur, A.A. Shmakova, D.T. Dyikanov, P.A. Vasiluev, Y.P. Rubtsov, K.A. Rubina, V.A. Tkachuk, CRISPR/Cas9 nickase mediated targeting of urokinase receptor gene inhibits neuroblastoma cell proliferation, *Oncotarget.* 9 (2018) 29414–29430. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.25647>.
- 4) E. Semina, K. Rubina, A. Shmakova, K. Rysenkova, P. Klimovich, N. Alexandrushkina, V. Sysoeva, M. Karagyaur, V. Tkachuk, Downregulation of uPAR promotes urokinase translocation into the nucleus and epithelial to mesenchymal transition in neuroblastoma, *JCP.* 235 (2020) 6268–6286. <https://doi.org/10.1002/jcp.29555>
- 5) F. Triana-Martínez, M.I. Loza, E. Domínguez, Beyond Tumor Suppression: Senescence in Cancer Stemness and Tumor Dormancy, *Cells.* 9 (2020) 346. <https://doi.org/10.3390/cell9020346>.
- 6) P.S. Klimovich, E. V. Semina, M.N. Karagyaur, K.D. Rysenkova, V.Y. Sysoeva, N.A. Mironov, G.D. Sagaradze, A.A. Az'muko, V.S. Popov, K.A. Rubina, V.A. Tkachuk, Urokinase receptor regulates nerve regeneration through its interaction with $\alpha 5\beta 1$ -integrin, *Biomed. Pharmacother.* 125 (2020) 110008. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110008>.
- 7) K.D. Rysenkova, P.S. Klimovich, A.A. Shmakova, M.N. Karagyaur, K.A. Ivanova, N.A. Aleksandrushkina, V.A. Tkachuk, K.A. Rubina, E. V. Semina, Urokinase receptor deficiency results in EGFR-mediated failure to transmit signals for cell survival and neurite formation in mouse neuroblastoma cells, *Cell. Signal.* 75 (2020) 109741. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2020.109741>.