

**Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования «Национальный исследовательский университет
«Высшая школа экономики»**

Факультет компьютерных наук

Магистерская программа «Анализ данных в биологии и медицине»

КУРСОВАЯ РАБОТА

На тему «Изучение гетерогенности опухолевого микроокружения с
использованием данных scRNA-seq»

Студент группы № МАДБМ21
Осинцева Екатерина Дмитриевна
(Ф.И.О.)

Руководитель КР
доцент, к.ф.-м.н.
Попцова Мария Сергеевна
(должность, звание, Ф.И.О.)

Москва, 2022

Содержание

Аннотация.....	3
1. Введение.....	4
2. Технологии секвенирования единичных клеток и их применение.....	7
3. Описание эксперимента.....	11
4. Описание данных.....	12
5. Предобработка данных с помощью Seurat.....	13
6. Аннотация клеток по типам.....	14
7. Поиск дифференциально экспрессированных генов.....	20
8. Формирование списка генов, задействованных в различных видах клеточной гибели.....	21
9. Результаты.....	22
Заключение.....	45
Список литературных источников.....	47
Приложение.....	53

Аннотация

Исследование гетерогенности опухолевого микроокружения и взаимодействия его клеток друг с другом и с опухолью может помочь раскрыть механизмы, с помощью которых опухоли удается избегать иммунного ответа. Понимание этих механизмов представляет собой ценность в первую очередь для разработки различных способов иммунотерапии.

В данной работе анализировались четыре образца метастазов в паренхиме головного мозга. Для каждого из них были найдены пары взаимодействий между различными типами клеток по принципу лиганд-рецептор. Первичный анализ показал во всех 4-х образцах наличие взаимодействий между клетками посредством лиганда MIF, в частности это взаимодействие наблюдалось между метастатическими клетками и клетками иммунной системы. Изучение литературы показало, что такие взаимодействия могут приводить к прогрессированию опухоли и иммуносупрессии.

MIF также задействован в механизме пироптоза – одном из типов клеточной смерти. По этой причине, а также с целью исследования концепции, предложенной Аланом Гербертом о «братоубийстве» иммунных клеток друг друга, были исследованы дифференциально экспрессированные гены в каждом типе клеток на наличие среди них генов, связанных с механизмами клеточной гибели. Первичный анализ показал, что в метастатических клетках сверхэкспрессированы гены, задействованные в энтопической смерти, а в макрофагах – в пироптозе. Первому процессу предшествует энтоз, а второму – образование инфламмосомы. На данном этапе анализа нельзя с полной уверенностью утверждать, действительно ли эти процессы в дальнейшем приводят к клеточной гибели, однако из литературных источников известно, что оба эти процесса могут способствовать выживанию и прогрессированию опухоли.

1. Введение

На сегодняшний день под термином «микроокружение опухоли» (Tumor Microenvironment, TME) понимают совокупность компонентов солидной опухоли, включая ее сосудистую сеть, ассоциированные с опухолью фибробласты, различные иммунные клетки и внеклеточный матрикс [1]. Однако подход к тому, как определять микроокружение может быть усложнен. К примеру, в работе [2] определяют 6 различных слоев опухолевого микроокружения, различающихся как пространственно, так и по своим свойствам.

Вопрос о том, поддерживает ли TME развитие опухоли или опухоль изменяет его в пользу своего развития, остается спорным [2]. Но известно, что иммунные клетки TME могут индуцироваться опухолевыми клетками для производства большого количества факторов роста и цитокинов.

В XX веке появилась концепция, разделяющая макрофаги на классические макрофаги или M1 и на альтернативные макрофаги M2, которые по-прежнему считаются прототипом макрофагов, ассоциированных с опухолью (Tumor associated macrophages, TAMs) [3]. Хотя также известно, что четкого деления на M1 и M2 типы нет – существует множество промежуточных состояний между этими полярными фенотипами.

TAMs обладают клеточной гетерогенностью, то есть различными генетическими, эпигенетическими свойствами. При этом они адаптируют свой фенотип в зависимости от внешних условий. Внутриопухолевая поляризация TAM определяется составом цитокинов, происходящих из опухоли, по сравнению с цитокинами, происходящими из иммунных клеток [4], факторами роста [5], оксигенацией и составом метаболического субстрата, а также многими другими факторами. Действие всех этих факторов в совокупности определяет, будут ли TAM дифференциально поляризованы в сторону более проопухолевого фенотипа или противоопухолевого. И хотя присутствует

гетерогенность этих трансформационных профилей и фенотипов макрофагов даже в одной опухоли, классическая номенклатура фенотипов TAM, M2 и M1, может быть полезна для обозначения противовоспалительного, проопухолевого и воспалительного, противоопухолевого поведения, соответственно [6]. Но необходимо помнить об этой гетерогенности, поскольку не всегда воспалительное поведение означает противоопухолевое, наоборот известно, что при инициации опухоли TAMs создают воспалительную среду, которая является мутагенной и способствует росту за счет, например, рекрутирования кровеносных и лимфатических сосудов. По мере прогрессирования опухоли в злокачественную макрофаги стимулируют ангиогенез, усиливают миграцию и инвазию опухолевых клеток и подавляют противоопухолевый иммунитет. Более того, в местах метастазирования макрофаги подготавливают ткань-мишень к прибытию опухолевых клеток. А другой фенотип макрофагов позволяет вновь прибывшим метастатическим клеткам «обосноваться» на новом месте [6].

Не только макрофаги оказывают иммуносупрессивное действие в микроокружении опухоли, подавление противоопухолевого иммунного ответа также сопровождается усиленной дифференцировкой Т-клеток CD4⁺ в клетки, способствующие развитию опухоли, такие как Т-хелперы 2-го типа (клетки Th2), клетки Th17 и популяции Treg [7].

Клетки иммунной системы активно взаимодействуют между собой, к примеру, дендритные клетки презентуют на своей поверхности антигены для Т-клеток, но в зависимости от условий взаимодействия могут происходить разными способами. Интересна концепция, которую изложил Алан Герберт в своей работе [8]. В ней он рассматривает теорию «братоубийства» друг друга различными типами клеток иммунной системы в зависимости от контекста. Для этого он вводит термин «щелчки» («clicks») означающий взаимодействие между парами лиганд-рецептор на поверхности клеток, которое приводит к гибели одной из них. Они имеют направленный характер и действуют как триггеры, позволяющие одной популяции респондентов устранить другую.

Примеры включают антиген-специфические рецепторы, которые инициируют цитотоксические реакции, и ингибиторы контрольных точек, вызывающие гибель клеток. Термин «щелчок» не является синонимом ни того, ни другого [8].

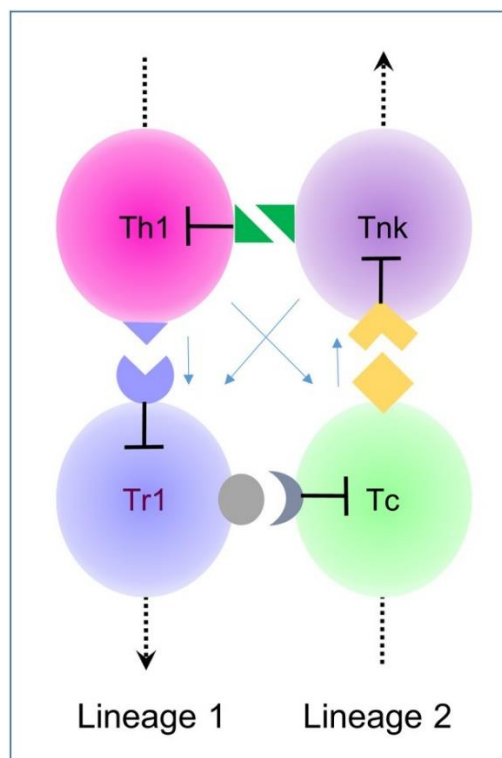


Рисунок 1 – Щелчки между хелперными клетками линии 1 типа (Th1 и Tr1) и цитотоксическими клетками (Tc и Tnk). Стрелки указывают направление от более ранних стадий развития к более поздним [8].

Клетки могут запускать пути смерти с помощью различных щелчков. Одним из них примеров является трансэндоцитоз. В одном примере CTLA-4 удаляет костимулирующие молекулы CD80 и CD86 с мембран наивных Т-клеток (Th0), предотвращая их полную активацию, обрекая их тем самым на гибель в результате апоптоза [8].

Технологии секвенирования одиночных клеток могут помочь в исследовании таких взаимодействий.

2. Технологии секвенирования одиночных клеток и их применение

Технологии секвенирования одиночных клеток получили активное развитие в последнее десятилетие. Одной из предпосылок их развития и методов анализа полученных с их помощью данных является исследование клеточной гетерогенности, которая может наблюдаться даже в одной клеточной линии во время процессов деления и дифференцировки [9]. Bulk секвенирование – секвенирование всего образца – позволяет изучить усредненные по всем клеткам в образце свойства, выделить доминирующие биологические процессы, однако профиль отдельных клеток при таком подходе остается неизвестным, а свойства малочисленных популяций клеток и информация о гетерогенности оказываются утрачены [10]. Так, исследуя образец ткани с помощью РНК-секвенирования, мы сможем узнать лишь усредненные по всем клеточным типам данные о количестве транскриптов, тогда как нас может интересовать их уровень в конкретном клеточном типе. Исследование гетерогенности клеток и клеточных популяций позволяют на новом уровне изучать биологические процессы, связанные с различными заболеваниями, в частности онкологическими. Также, к примеру, технологии секвенирования одиночных клеток применяются в изучение раннего развития эмбрионов [11].

С помощью технологий секвенирования одиночных клеток можно изучать омиксные данные различных уровней биологических процессов: геномы, транскриптомы, протеомы и эпигеномы. Секвенирование геномов одиночных клеток позволяет, к примеру, идентифицировать в них вариации числа копий (CNV – copy number variations) хромосомных сегментов и однонуклеотидные вариации [9]. Особенно широко распространено секвенирование РНК одиночных клеток или scRNA-seq (single-cell RNA sequencing), в частности транскриптомики [12]. Одним из применений scRNA-seq и технологий секвенирования одиночных клеток в целом является исследование онкологических заболеваний. Высокая степень гетерогенности

опухолевой ткани может быть связана с механизмами онкогенеза и метастазирования [10], что объясняет необходимость проводить анализ опухолевых клеток и клеток микроокружения опухоли на более детальном и высоком уровне. В связи с этим, применение таких технологий получило широкое распространение в исследовании опухолей и внесло существенный вклад в разработку новых методов диагностики и противоопухолевой терапии [10].

ДНК-секвенирование и РНК-секвенирование не позволяют получить информацию о концентрации белков и об их посттрансляционных модификациях, поэтому возникает необходимость в протеомике. Секвенирование протеома одиночных клеток открывает новые возможности в исследовании клеточной сигнализации, а также позволяет исследовать межклеточную гетерогенность на уровне белковых молекул [9]. Исчерпывающий анализ данных такого типа остается сложной задачей по причине недоступности подходов амплификации всего протеома [12].

Было разработано множество различных протоколов транскриптомики одиночных клеток. Существующие методы можно разделить на две группы на основании того, обеспечивают ли они покрытие транскрипта по всей длине (full-length методы) или частично секвенируют молекулу с 3'-конца или 5'-конца [13]. Среди преимуществ первой группы методов можно выделить возможность анализировать изоформы транскрипта и экспрессию аллелей. Кроме того, full-length протоколы могут лучше показывать себя в детектировании транскриптов с низким уровнем экспрессии [13]. Вторая группа подходов основана на использовании меток – UMI (unique molecular identifier). Среди нее выделяют подходы на основе капель, такие, например, как Drop-Seq и 10× Chromium, несомненным преимуществом которых является высокая пропускная способность и низкая стоимость по сравнению с full-length методами, поэтому такие протоколы незаменимы, когда целью является идентификация клеточных субпопуляций сложных тканей или образцов опухолей [10].

Анализ данных scRNA-seq

Для анализа данных scRNA-seq существует ряд пакетов: Seurat (язык R), Scan (язык R), Scanpy (язык Python), SingleCellExperiment (язык R).

В рамках курсовой работы для работы с scRNA-seq использовался пакет Seurat, поскольку данные, выбранные для работы, анализировались авторами исходной статьи [14] с помощью именного этого пайплайна. Кроме того, лаборатория Satija Lab, разработавшая и совершенствующая Seurat, предоставляет очень доступные инструкции по различным этап и видам анализа [15], также доступна подробная документация в Bioconductor. Пакет все время совершенствуется, последняя версия Seurat 4.0.6 была выпущена в декабре 2021-го года.

Исследование межклеточных взаимодействий

Межклеточные взаимодействия управляют развитием организма, гомеостазом и функциями одной клетки. Нарушение взаимодействий может приводить к развитию заболеваний и их прогрессированию. Расширение баз данных белок-белковых взаимодействий и недавние достижения в технологиях scRNA-seq позволили проводить рутинный анализ межклеточной передачи сигналов на основе измерений экспрессии генов, в частности, пары лиганд-рецептор можно использовать для вывода о межклеточной коммуникации. Такой вывод можно сделать на основании скоординированной экспрессии родственных им генов [16]. На сегодняшний день разработано несколько баз лиганд-рецептор и пакетов для R и Python, использующих различные статистические подходы, для установления наличия скоординированного взаимодействия.

Изучение межклеточных коммуникаций в сообществах клеток опухоли может показать, как клетки взаимодействуют друг с другом в этих системах, и помочь в разработке эффективных иммунотерапевтических средств против рака точно так же, как однажды ингибирование взаимодействий между PD1 и PDL1 произвело революцию в этой области [17].

Для анализа внутриклеточных взаимодействий в рамках работы был выбран программный пакет CellChat для R [17]. Пакет был выбран на основе изучения обзора по этой теме [16]. CellChat обладает следующими достоинствами, которых лишены ряд других инструментов (таких как iTALK, NicheNet):

- Учитывает, что ряд рецепторов функционируют как мульти-субъединичные комплексы.
- Учитывает другие важные сигнальные кофакторы, включая растворимые агонисты, антагонисты, а также стимулирующие и ингибирующие мембраносвязанные корецепторы.
- Предоставляет интуитивную визуализацию как аутокринных, так и паракринных сигнальных взаимодействий.
- Систематический подход к анализу более сложных взаимодействий.

Состав базы включает в себя взаимодействия из KEGG и курируемых литературных источников, учитываются как взаимодействия посредством пар лиганд-рецептор, так и взаимодействия через межклеточные контакты и взаимодействия по типу внеклеточный матрикс-рецептор (Рисунок 2) [17].

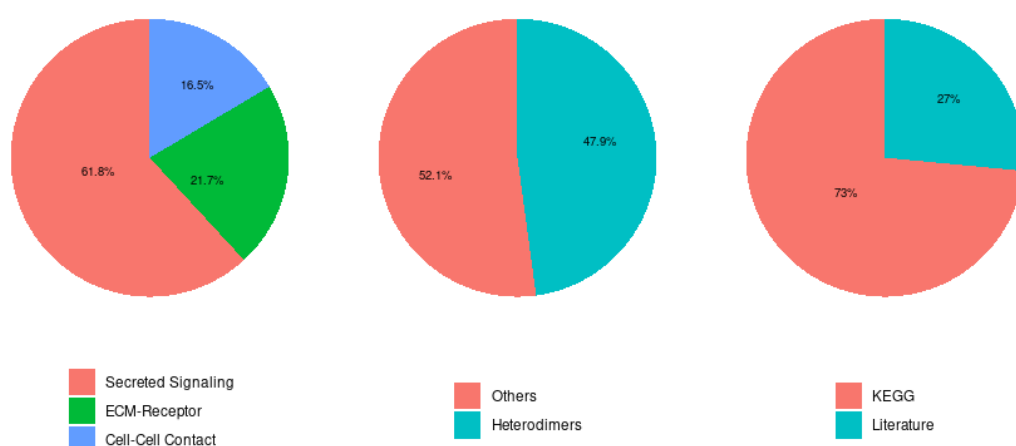


Рисунок 2 – Описание базы CellChatDB

3. Описание эксперимента

На первом этапе данные подсчетов scRNA-seq обрабатывались с помощью пакета для R Seurat версии 4.0.6. Проводился контроль качества клеток, фильтрация, а также нормировка и стандартизация данных. Затем в практических целях с помощью Seurat была проведена интеграция нескольких образцов для устранения batch-эффекта, а также была предпринята попытка аннотировать клетки по типам на основании маркерных генов, взятых из литературных источников. На дальнейших шагах использовалась аннотация клеток по типам, предоставленная авторами статьи [14].

Изучались межклеточные взаимодействия (cell-cell interactions) с помощью пакета CellChat для R. Были получены значимые пары сигналинга лиганд-рецептор, пары взаимодействия межклеточных контактов и взаимодействие внеклеточного матрикса и рецепторов. На данном этапе работы анализировались взаимодействия по типу лиганд-рецептор.

Для каждого клеточного типа в каждом из исследуемых образцов был получен список генов, дифференциально экспрессированных в конкретном клеточном типе по сравнению с другими клеточными типами в образце. При отборе генов для скорректированного p -value (p_{adj}) использовался уровень значимости $\alpha = 0.001$. Далее, из баз KEGG PATHWAY [18], Gene Ontology [19], а также литературных источников были собраны списки генов, задействованных в различных путях клеточной гибели, и для всех клеточных типов было проверено, какие гены каждого из путей присутствуют среди обнаруженных сверхэкспрессированных генов.

Далее проводился литературный поиск, а также применялись средства визуализации, доступные в пакетах Seurat и CellChat, для наглядной работы с данными и интерпретации результатов. Подробнее изучались обнаруженные гены, задействованные в клеточной гибели. Также изучались некоторые обнаруженные с помощью CellChat пары лиганд-рецептор. На основании проделанных шагов была предпринята попытка обобщить результаты,

выявить похожие программы среди рассматриваемых образцов и отличия, а также выдвинуть гипотезы, которые можно было бы проверить в дальнейшем и более подробно изучить литературу по этой теме.

4. Описание данных

В рамках курсовой работы исследовались данные подсчетов scRNA-seq, полученных из образцов метастазов в паренхиму головного мозга (GEO: GSE186344). Рассматривались образцы 5-ти пациентов: 3-х пациентов с диагностированным раком молочной железы, 1-го пациента с диагностированным раком легкого и 1-го пациента с раком яичников. В таблице 1 представлена информация о поле, возрасте каждого пациента [14], а также accession id образца в GEO. Условное обозначение, принятое в Таблице 1 для каждого пациента, будет далее использоваться в тексте работы.

Таблица 1 – Информация о пациентах

Первичная опухоль	Условное обозначение	Возраст	Пол	Ссылка на GEO
Рак молочной железы	Breast-1	75	Женский	GSM5645891
Рак молочной железы	Breast-2	38	Женский	GSM5645892
Рак молочной железы	Breast-3	72	Женский	GSM5645893
Рак легкого	Lung-2	57	Женский	GSM5645895
Рак яичников	Ovarian-2	42	Женский	GSM5645898

Пациентка Breast-1 за 24 часа до хирургического вмешательства проходила терапию гамма-облучением. Остальные пациенты до проведения операции не получали химиотерапии или лучевой терапии. В четырех случаях метастазы находились в коре головного мозга, только у пациентки Breast-3 метастазы были обнаружены в мозжечке [14].

scRNA-seq профилирование проводилось с помощью платформы 10x drop-seq компании 10x Genomics [20]. Библиотеки одиночных клеток были получены с помощью прибора Chromium Controller и набора реагентов Single Cell Reagent Kit 3' v2. Секвенирование проводилось прибором модели Illumina NovaSeq 6000. Далее сырые риды в формате FASTQ выравнивались на геном сборки с помощью пайплайна Cell Ranger версии 3.0.2 10x Genomics. В данной работе, как было указано ранее, обрабатывались подсчеты, то есть данные на выходе пайплайна.

5. Предобработка данных с помощью Seurat

Предобработка данных производилась в соответствии с обучающим материалом, предоставленным лабораторией Saitja Lab. Параметры фильтрации клеток решено было взять такими же, как использовали авторы публикации [14].

В первую очередь функцией `Read10X()` из предварительно созданной для каждого образца директории считывались файлы с названиями признаков, баркодами клеток и матрицей подсчетов. Далее создавался объект с помощью функции `CreateSeuratObject()`, с именем проекта, соответствующим условному обозначению образца. Также устанавливался параметр `min.cells = 5`, для того, чтобы отфильтровать гены, экспрессия которых была обнаружена менее, чем в 5 клетках. Затем в каждой клетке было подсчитан процент митохондриальных генов с помощью функции `PercentageFeatureSet()` и параметра `pattern = "^MT-`". Были визуализированы основные метрики качества. Далее клетки были отфильтрованы с параметрами, использованными авторами [14], а именно:

- `nFeature_RNA > 500` (число признаков РНК, то есть генов, должно превышать 500)
- `nFeature_RNA < 9000` (но при этом число признаков должно быть меньше 9000)

- `percent.mt < 10` (митохондриальной ДНК должно быть меньше, чем 10%)

После этого была проведена нормировка данных с помощью `NormalizeData`, с параметрами по умолчанию. В этом случае отсчеты пересчитываются следующим образом (1) для каждой j -й клетки:

$$c_{i_norm}^j = \ln \left(\frac{c_i^j}{\sum_{i=1}^n c_i^j} \cdot 10000 + 1 \right) \quad (1)$$

Где c_i^j — число подсчетов i -го гена (признака) в j -й клетке.

Далее, с помощью небольшого цикла в R к метаданным объекта была добавлена информация о типе каждой клетки на основании ее баркода. Авторы статьи исключали некоторые клетки из анализа несмотря на то, что они проходили контроль качества, поскольку кластер (то есть принадлежность к популяции конкретного типа клеток) определялся для них неоднозначно. Такие клетки в данной работе не рассматривались при дальнейшем анализе.

После того как все клетки были отобраны, к данным применялась функция `ScaleData()` с настройками по умолчанию, которая экспрессию каждого признака (гена) приводит к стандартному распределению путем вычитания из признака среднего уровня экспрессии по всем клеткам и делением разности на стандартное отклонение. Далее можно применить метод главных компонент, а затем применить к первым 15-20 компонентам UMAP преобразование для визуализации клеток в двумерном пространстве.

6. Аннотация клеток по типам

Ранее было сказано, что к образцам была добавлена информация о типе каждой клетки. Всего авторы статьи выделили 21 тип клеток (Рисунок 2D). Для того, чтобы разделить клетки по типам, авторы объединяли 14 образцов, интегрируя их с помощью `Seurat`. Интегрирование образцов позволяет устранить batch-эффект при объединении образцов, который состоит в

формировании клетками групп на основании того, из какого они пришли образца, тогда как нам необходимо, чтобы клетки образовывали кластеры на основании клеточного типа. Авторы статьи объединяли данные биопсий разных пациентов, чтобы более точно разделить клетки на типы, поскольку в половине образцов подавляющую долю составляла фракция опухолевых клеток. При таком подходе опухолевые и стромальные клетки лучше разделяются, так как расстояния между кластерами оказывается в этом случае больше. Более того, такой подход позволяет выявить редкие клеточные типы, такие как астроциты [14]. Авторы проводили PCA и UMAP, запускали алгоритм кластеризации и визуализировали результат кластеризации в осях UMAP. Далее авторы устанавливали, клетки какого типа образуют тот или иной кластер, на основании известных маркерных генов. В таблице 2 приведен список выделенных клеточных типов с небольшим описанием каждого из них и маркерными генами. Также авторы валидировали результаты и дополняли исследование данными, полученных с помощью масс-цитометрии.

С целью обучения и дальнейшего использования навыка на новых данных, в ходе работы мной была предпринята попытка провести интеграцию и аннотирование данных самостоятельно. Однако этот процесс оказался очень ресурсозатратным для компьютера, поэтому мне удалось интегрировать только 3 образца: Breast-1, Breast-2 и Breast-3 (Рисунок 3А). На трех образцах расстояние между кластерами было не таким большим и в целом клетки хуже отделялись, чем в случае 14 образцов. При разрешении 0.3 выделились 17 кластеров (Рисунок 3В). Путем использования маркерных генов, взятых из статьи (Таблица 2) [14], удалось определить крупные кластеры клеток. Однако удалось выделить кластеры на низком уровне детализации. Сложность в определении кластеров возникла по причине, во-первых, малого содержания клеток некоторых популяций, например, В-клеток, а также невозможности определить тип лишь по трем образцам для некоторых кластеров.

Таблица 2 – Клеточные типы и фенотипы, обнаруженные в исследуемых образцах.

Обозначение	Название и краткое пояснение	Маркерные гены	Общие маркерные гены
Astrocytes	Астроциты	GFAP, S100B	
EC-1	Эндотелиальные клетки (переходный фенотип)	APLNR, ESM1	CLDN5, PECAM1
EC-2	Эндотелиальные клетки (венозный фенотип)	ACKR1, NR2F2	
EC-3	Эндотелиальные клетки (артериальный фенотип)	EFNB2, GJA5	
PC-1	Перициты	MMP9	RGS5, ACTA2
PC-2	Перициты	MMP11	
PC-3	Перициты	SMOC2	
vSMCs	Гладкомышечные клетки сосудов	ACTG2	
MSC-like-1	Клетки, подобные мезенхимальным стромальным клеткам (1-го типа)		ISLR, CTHRC1
MSC-like-2	Клетки, подобные мезенхимальным стромальным клеткам (2-го типа)		
MTCs	Метастатические опухолевые клетки	KRT18	KRT18
MAMs:APOE+	Метастаз-ассоциированные макрофаги	APOE, C1QB, TREM2	AIF1, LYZ
MAMs:S100A8+	Метастаз-ассоциированные макрофаги	S100A8, IL1B, FCN1	
cDC2:CD1C+/CLEC10A+	Дендритные клетки	CD1C, CLEC10A	
T:CD8+:EM	CD8+ эффекторные Т-клетки памяти	GZMA, IFNG	CD3D, IL7R
T:CD4+:CM1	Центральные Т-клетки памяти	LTB, IL32, IL7R	
T:CD4+:CM2	Центральные Т-клетки памяти		
Tregs	Регуляторные Т-клетки	KCNJ10	
T:CM	Центральные Т-клетки памяти	ISG15, MX1	
B-c1	В-лимфоцит		JCHAIN
B-c2	В-лимфоцит		MZB1

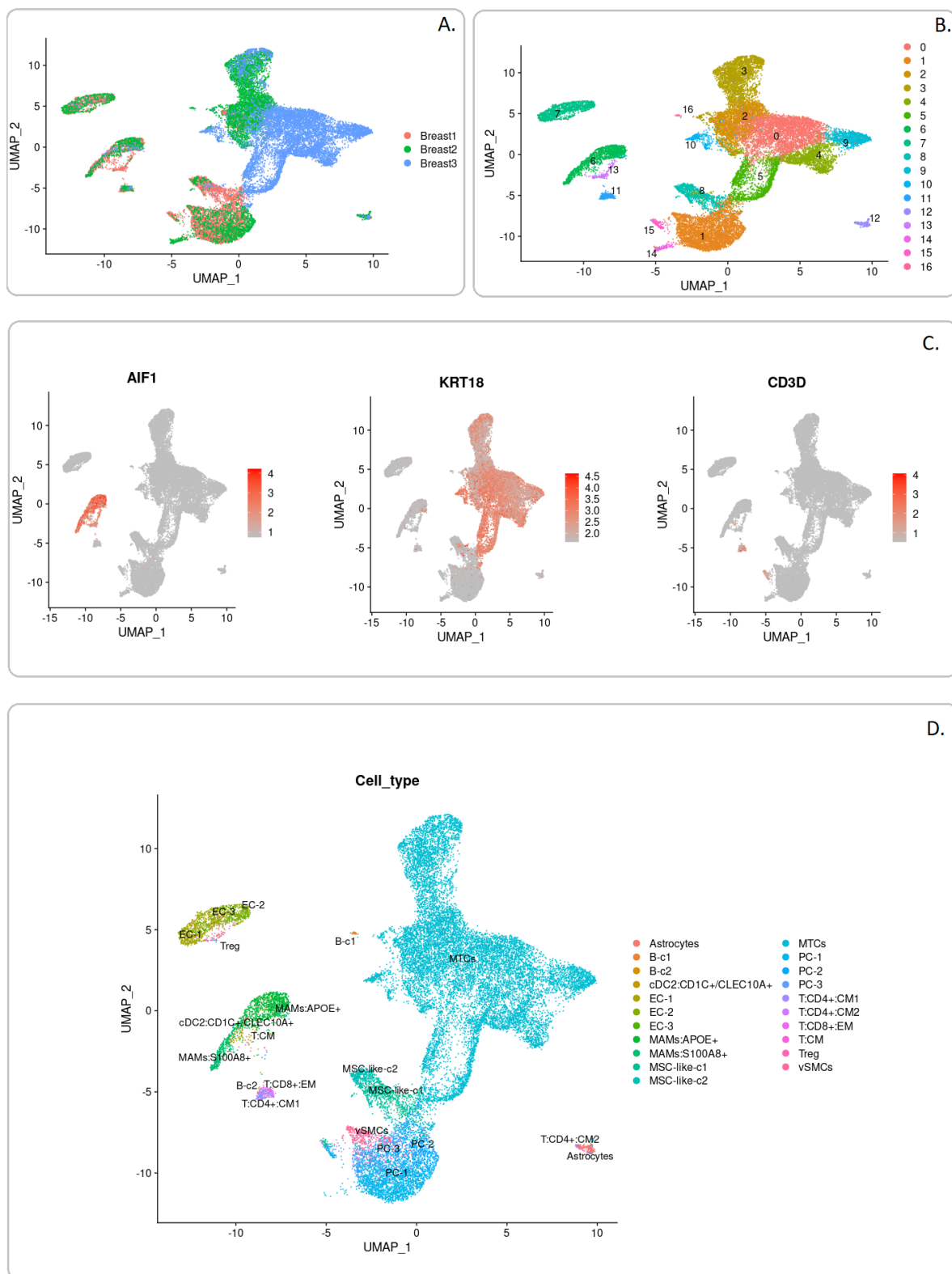


Рисунок 2 – А. Результат интеграции 3-х образцов. В. Найденные кластеры в объединенных данных. С. Подсветка маркерных генов для различных клеточных типов. D. Аннотация, представленная в [14]

Состав клеточной популяции в образцах

В различных образцах отличалось соотношение опухолевых клеток и клеток стромы, так, в образце Breast-1 опухолевые клетки составляют лишь 6% от всей популяции клеток, тогда как в образце Breast-3 98.4% образца представлены опухолевыми клетками (Рисунок 1). Образец Breast-2 занимает промежуточное положение – опухолевые клетки составляют 64.5% от общего числа клеток (Рисунок 4). В образце Breast-1 присутствовали клетки всех обнаруженных типов (Таблица 1), однако некоторые типы были представлены очень малым количеством клеток: В-лимфоциты обоих фенотипов В-с1 (7 клеток) и В-с2 (1 клетка), Т-клетки фенотипов Т:CD4+:СМ2 (9 клеток) и Т:СМ (1 клетка). В образце Breast-2 отсутствовали клетки фенотипов В-с2 и Т:СМ, а в образце Breast-3 – MSC-like-1, В-с2, Т:СМ, vSMCs. Кроме того, в третьем образце 11 из 17 фенотипов были представлены менее, чем 10 клетками (Приложение, таблица 1). По этой причине образец был исключен из анализа.

Опухолевые клетки в образце рака легкого Lung-2 составляют 36.6% от общего числа клеток, в раке яичников Ovarian-2 – 76.95%. В образцах рака легкого Lung-2 и рака яичников Ovarian-2 представлены клетки всех перечисленных в Таблице 1 фенотипов (Приложение, таблица 2). В этих образцах меньше представлены астроциты: 5 клеток в образце Lung-2 и 11 клеток в образце Ovarian-2.

Стоит отметить, что в образцах пациентов с диагностированным раком молочной железы, наблюдаются высокое содержание макрофагов по сравнению с другими типами клеток иммунного ландшафта. В образцах Lung-2 и Ovarian-2 представленность макрофагов значительно ниже, в них больше представлены Т-лимфоциты. В образце Ovarian-2 наблюдается наибольшее число В-лимфоцитов обоих фенотипов (212 клеток).

Таблица 3 – Размеры популяций клеток всех типов в образцах

Образец	Breast-1	Breast-2	Breast-3	Lung-2	Ovarian-2
Число клеток	6196	7639	9366	2773	5102

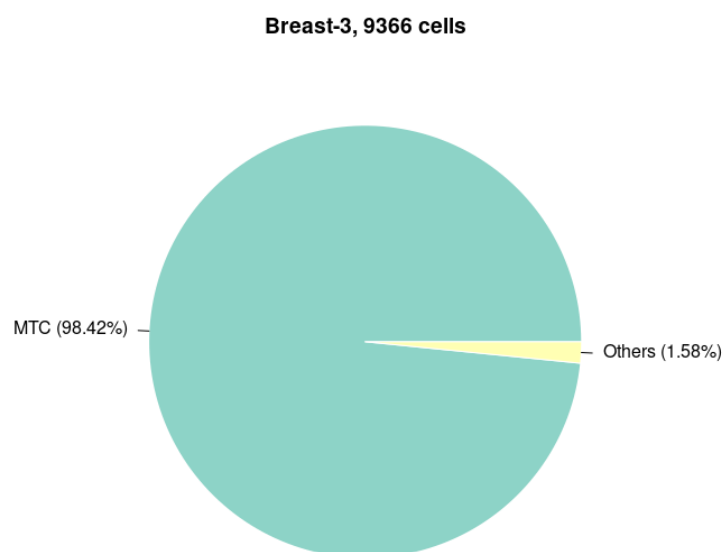
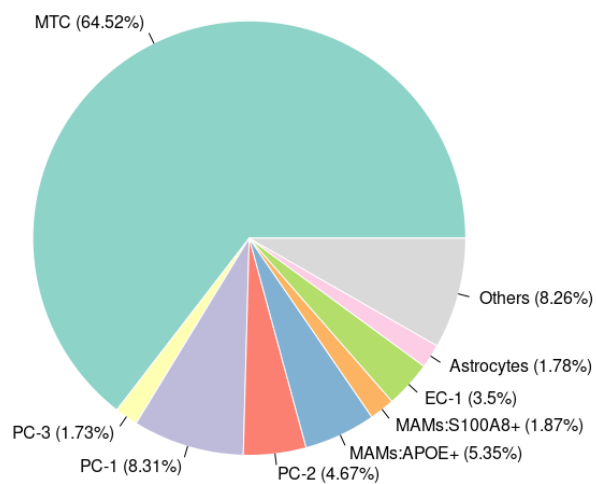
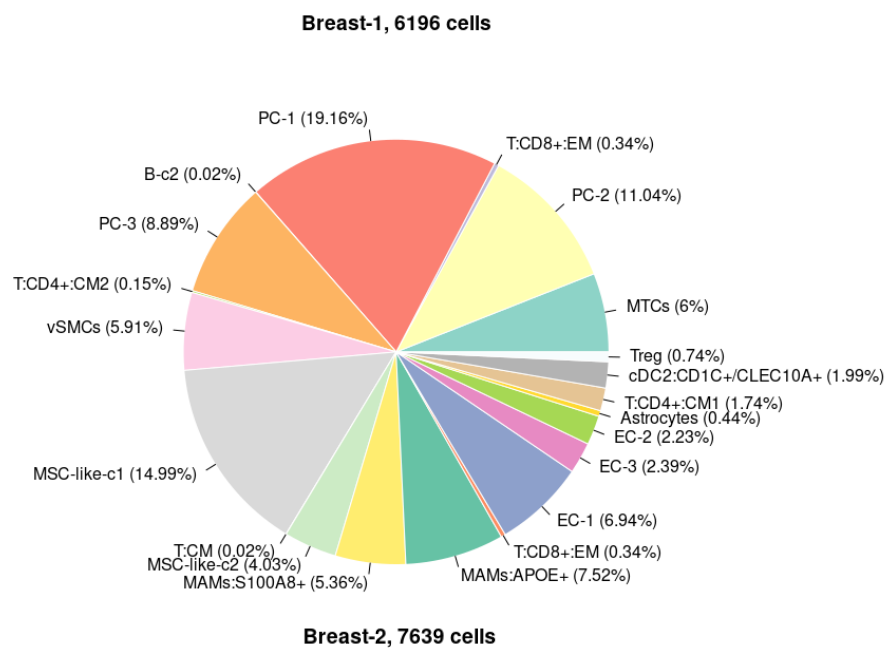


Рисунок 4 – Представленность клеток в образцах от пациентов с раком молочной железы

7. Поиск дифференциально экспрессированных генов

Для каждого из образцов (за исключением Breast-3) были установлены гены, которые дифференциально экспрессированы в том или ином типе клеток. Дифференциальный анализ проводился с помощью функции `FindAllMarkers()` из пакета Seurat с параметрами по умолчанию.

По умолчанию функция использует ранговый тест Уилкоксона (Wilcoxon Rank Sum test) для двух выборок. В данной работе проводился анализ по принципу «один против всех», то есть уровень экспрессии генов сравнивался с уровнем экспрессии генов в объединенной выборке всех остальных кластеров клеток. К размеру кластера предъявляется требование – в нем должно быть минимум 3 клетки. Также был задан порог на минимальное значение $\log FC$, равное 0.25. В этом случае есть риск пропустить более слабые сигналы, однако в дальнейшем планируется сравнить результаты при использовании других настроек. Также, для ускорения работы функции Seurat по умолчанию использует параметр $\text{min.pct} = 0.1$, который задает требование к минимальной доле клеток в каждой из групп, которая должна экспрессировать рассматриваемый ген. Таким образом, если экспрессия какого-либо гена обнаружена менее, чем 10% клеток группы, то он не анализируется. Seurat использует для поправки на множественное тестирование гипотез поправку Бонферрони.

Был выбран уровень значимости $\alpha = 0.001$. Для дальнейшего анализа отбирались только сверхэкспрессированные гены в каждом из кластеров клеток. Таким образом, для каждого из образцов, для каждого кластера клеток были отобраны гены с положительным значением $\log FC$ и $p.\text{adj} < 0.001$. Далее находилось пересечение списков полученных генов с генами, связанными с различными типами клеточной гибели.

8. Формирование списка генов, задействованных в различных видах клеточной гибели

В данной работе использовалась классификация клеточной гибели, составленная Комитетом номенклатуры по гибели клеток (Nomenclature Committee on Cell Death, NCCD) в 2018 году [20]. В базе KEGG PATHWAY [18], в группе путей «клеточные процессы», есть карты для апоптоза, некроптоза, ферроптоза (Таблица 4). Гены для этих путей были извлечены из базы KEGG. Для остальных программ клеточной гибели гены были взяты из обзора NCCD, и частично из Gene Ontology. Некоторые программы, взятые из KEGG, также были дополнены генами из рекомендаций.

Таблица 4 – Пути и сети клеточной гибели в KEGG

	Имя в KEGG PATHWAY	Entry
Апоптоз	Apoptosis - Homo sapiens (human)	hsa04210 Pathway
Некроптоз	Necroptosis - Homo sapiens (human)	hsa04217 Pathway
Ферроптоз	Ferroptosis - Homo sapiens (human)	hsa04216 Pathway
Внутренний путь апоптоза	Intrinsic apoptotic pathway	N00098 Network
Внешний путь апоптоза	Extrinsic apoptotic pathway	N00145 Network

Клеточная гибель – необратимая дегенерация жизненно важных для клетки функций, таких как производство АТФ и сохранение окислительно-восстановительного гомеостаза, приводящая к потере клеточной целостности [20]. Клеточную смерть можно классифицировать на регулируемую клеточную гибель и случайную клеточную гибель (ACD). ACD представляет собой мгновенную гибель клеток под воздействием сильных факторов физической (высокое давление, температура), химической (экстремальные изменения pH среды) или механической природы. Регулируемая клеточная гибель является естественным процессом в многоклеточных организмах, поскольку поддерживает их гомеостаз как в физиологических, так и в патологических условиях RCD опирается на молекулярные механизмы.

9. Результаты

Энтоз и энтотическая клеточная гибель

Энтотическая гибель клеток — это тип RCD, который возникает в результате актомиозин-зависимой интернализации по типу «клетка-в-клетке» (энтоза) и реализуется лизосомами [21]. Энтоз представляет собой форму клеточного каннибализма, возникающую в здоровых и злокачественных тканях млекопитающих, при которой жизнеспособные клетки поглощаются нефагоцитирующими клетками того же (гомотипический энтоз) или другого (гетеротипический энтоз) типа [22, 23]. Не всегда за интернализацией следует гибель поглощенной клетки. Существующая на сегодняшний день модель энтоза предполагает, что при нем действуют не фагоцитарные механизмы поглощения – интернализация происходит путем инвазии [22].

Энтоз происходит в условиях утраты клетками адгезии с внеклеточным матриксом, в результате чего также может запускаться аноиксис – другой механизм клеточной гибели [22], представляющий собой специфический вариант внутреннего апоптоза, инициированный потерей клеткой интегрин-зависимого закрепления [21].

Энтозу способствует образование соединений между поглощающими и энтотическими клетками, в которых участвуют белок-рецептор клеточной адгезии E-кадгерин (CDH1) и белок катенин альфа-1 (CTNNA1). В отличие от клеток, подвергшихся фагоцитозу, энтотические клетки (клетки, подвергшиеся энтозу) играют активную роль в контроле своего поглощения, которая заключается в активности в них белка RHOA и RhoA эффекторных киназ – ROCK1/ROCK2 (Rho associated coiled-coil containing protein kinase 1) [24]. В соответствии с литературными данными, сверхэкспрессии RhoA или ROCK1/2 клетками достаточно, чтобы стимулировать их поглощение эпителиальными клетками, экспрессирующими кадгерин [21, 25].

При энтозе наблюдается следующий паттерн локализации актина и миозина: тяжелые и лёгкие цепи накапливаются внутри интернализирующих

клеток в полюсе актомиозиновой коры, противоположном границе соединения клеток посредством Е-кадгерина, а в клетках-поглотителях, напротив, накопления не происходит [25-27]. Процесс дальнейшего поглощения связан с комбинируемой активностью двух белков:

- белка p190-RhoGAP (Rho-GTPase activating protein, RhoGAP), кодируемого геном ARHGAP35, который рекрутируется в межклеточные соединения, опосредованные Е-кадгеринами, и ингибирует RHOA
- белка PDZ-RhoGEF (Rho-guanine exchange factor, RhoGEF), кодируемого геном ARHGEF11, который рекрутируется в противоположный соединению полюс интернализирующей клетки и активирует RHOA.

В результате этого образуется зона сокращения актомиозина, поляризованная таким образом, чтобы способствовать захвату клетки [25, 26].

Большинство интернализованных клеток подвергаются энтотической гибели клеток, реализуемой лизосомами (Рисунок 4), и происходит независимо от белков BCL2 и каспазы 3 [21]. В этом процессе задействована легкая цепь 3 бета белка, ассоциированного с микротрубочками 1 (MAP1LC3B, известный как LC3), белки, связанные с аутоофагией, ATG5 и ATG7, а также каталитическая субъединица фосфоинозитид-3-киназа класса 3 (PIK3C3, известная также как VPS34) (Рисунок 4). Эти белки рекрутируются на цитозольную сторону везикул, в которых находятся поглощенные клетки, и способствуют слиянию этих клеток с лизосомами [28].

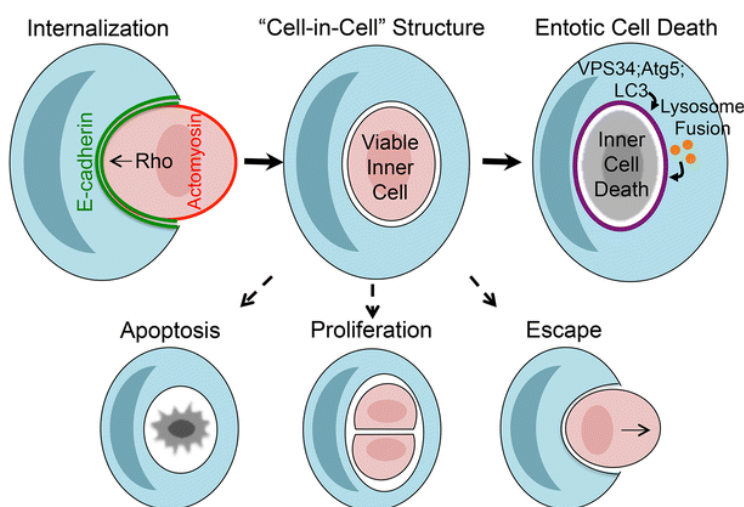


Рисунок 4 – Механизм энтоза и энтотической клеточной смерти [22]

В образцах Breast-1, Breast-2, Lung-2 и Ovarian-2 среди дифференциально экспрессированных генов были обнаружены гены, кодирующие белки, которые задействованы в энтозе (Таблица 5). Можно заметить, что во всех образцах, за исключением Breast-2 в метастатических клетках сверхэкспрессированы CDH1, RAC1 и EZR. Кроме того, CTNNA1 и KRAS сверхэкспрессированы как в образце Breast-1, так и в Ovarian-2. В MTCs клетках образца Breast-2 RAC1 напротив показывает значимо сниженный уровень экспрессии, при этом оказывается сверхэкспрессирован во многих других клеточных фенотипах: EC-1, EC-2, EC-3, MAMs:APOE+, PC-1, PC-2, PC-3. Остальные гены не показывают сниженный в сравнении с другими типами уровень экспрессии. Роль генов RAC1, KRAS и EZR в энтозе будет описана далее.

Таблица 5 – Сверхэкспрессированные гены, задействованные в энтозе

	Breast-1	Breast-2	Lung-2	Ovarian-2
Astrocytes	CTNNA1	CTNNA1		
EC-1	KRAS, CTNNA1	CTNNA1, RAC1, CDC42, RHOA		
EC-2		RAC1, RHOA		
EC-3	KRAS, RAC1, CTNNA1, CDC42	RAC1		
MAMs:APOE+	RHOA	RAC1	RAC1	
MAMs:S100A8+	RHOA, CDC42			
MTCs	CDH1, RAC1, CTNNA1, EZR, KRAS		RAC1, EZR, CDH1	CTNNA1, RAC1, CDH1, KRAS
PC-1		CDC42, ROCK1, RAC1, RHOA	RHOA	RAC1, RHOA
PC-2		RAC1	RHOA	
PC-3		RAC1, RHOA	RHOA	
T:CD4+:CM1	EZR			EZR
T:CD8+:EM			KRAS	
Treg				EZR
cDC2:CD1C+/CLEC10A+	EZR			
vSMCs	ROCK1	RHOA	RHOA	

Дифференциальная экспрессия RHOA наблюдается в клетках разных типов: макрофагах (Breast-1); в эндотелиальных клетках, перицитах и vSMCs (Breast-2); в перицитах и vSMCs (Lung-2); в перицитах (Ovarian-2). Эти данные согласуются с данными по экспрессии, представленными в The Human Protein Atlas (THPA) [29]. ROCK1 дифференциально экспрессирован ген ROCK1 в vSMCs (Breast-1) и в PC-1 (Breast-2), что также согласуются с данными THPA.

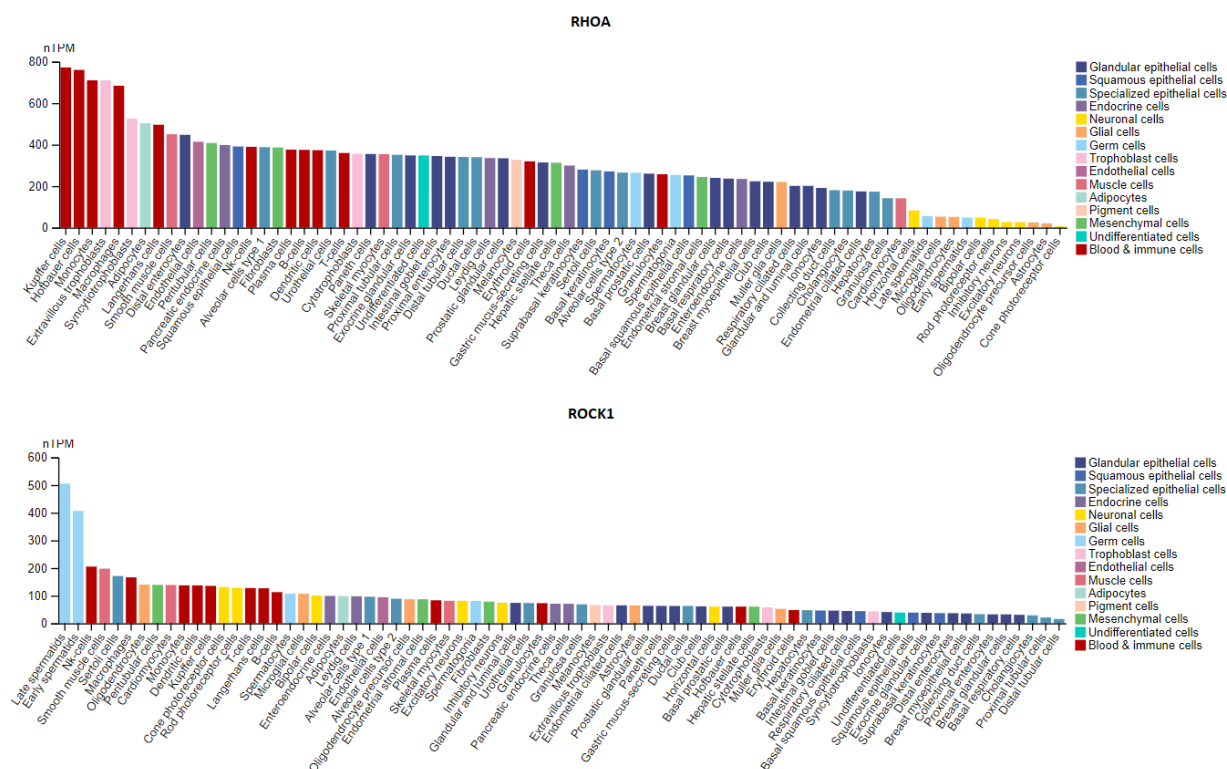


Рисунок 5 – Уровень экспрессии генов в тканях разного типа [29]

Существуют экспериментальные данные, свидетельствующие о том, что энтоз может частично снижать рост клеток, выращенных в культуре, за счет их гибели внутри клетки-поглотителя (Рисунок 6А) [22, 28]. Однако было показано, что энтоз может содействовать прогрессированию опухоли следующими способами:

- 1) Во-первых, поглощенные клетки препятствуют делению клетки поглотителя и нарушают цитокинез, блокируя борозду деления, что может привести к анеуплоидии клетки поглотителя [30]. Литературные данные свидетельствуют о том, что это способствует онкогенезу при раке молочной железы [31].

- 2) Во-вторых, поглощающие клетки восстанавливают питательные вещества из переваренных клеток, поддерживая тем самым выживание и пролиферацию в условиях голодания [32].

Литературные данные свидетельствуют о наличии корреляции между энтозом и плохим прогнозом у пациентов [33].

Кроме того, существуют гипотеза о конкуренции между клетками. В соответствии с этой гипотезой, клетка может оказаться победителем или проигравшим после установления соединения с клеткой соседом, в зависимости от активности Rho-пути или активности актомиозина. Было показано, что победители обладают низким механическим напряжением или более деформируемы (согласуется с более низким уровнем актомиозина) в сравнении с проигравшими клетками [34]. Таким образом, энтоз предположительно может вносить вклад в отбор более деформируемых клеток, что подкрепляется данными о том, что с прогрессированием опухоли клетки становятся более деформируемыми [22, 35].

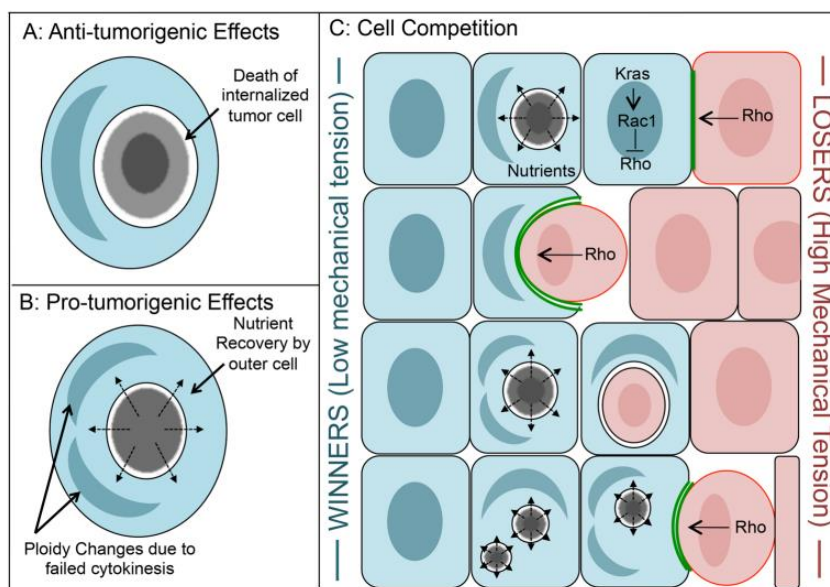


Рисунок 6 – Двойная роль энтоза в онкогенезе. А. Противоопухолевый эффект за счет инициирования смерти злокачественных клеток. В.

Проопухолевый эффект. С. Конкуренция клеток

Различие в механической активности клеток может быть связано с генетическими различиями активности путей, которые отвечают за регуляцию

активности актина и миозина. К примеру, одним из путей, который может влиять на этот конкурентный механизм, является путь Kras, где активация Rac1 с помощью Kras снижает RhoA/ROCK-зависимую контрактильность и напряжение актомиозина, что позволяет клетке победить [22].

Как было отмечено ранее, во всех образцах, за исключением образца Breast-2, наблюдалась дифференциальная экспрессия гена CDH1. Дальнейшее изучение показало, что CDH1 экспрессируется приблизительно в 75% метастатических клеток в образцах Breast-1 и Lung-2, и в 25% MTCs образца Ovarian-2 (Рисунок 7). При этом, CTNNA1 экспрессируется примерно в такой же доле клеток, что и CDH1.

Примечательно, что RAC1 экспрессируется в большом проценте клеток (75%-100%) в каждом из образцов, и, так же, как и CDH1, он дифференциально экспрессирован в метастатических клетках. Может показаться, что уровень RAC1 очень высокий в клетках vSMCs, PC-3, EC-2 и астроцитах, при этом ген экспрессирован почти во всех клетках, однако стоит отметить, что популяция этих клеток очень мала (около 10 клеток), поэтому они несколько искажают картину. Уровень экспрессии RHOA и ROCK1 также оказывается ниже в метастатических клетках, что может быть связано как с тем, что в других типах клеток он в целом выше [29], так и с тем, что в соответствии с изложенной выше теорией о клетках-победителях и клетках-проигравших, в части клеток Rho путь подавляется, делая их более подвижными, что, соответственно, может быть связано с активностью в части клеток KRAS и/или RAC1.

На основании имеющихся данных трудно выстроить теорию взаимосвязи между экспрессиями генов, однако есть основания полагать наличие в 3-х из 4-х образцах энотической активности в метастатических клетках. Если судить по активности генов, связанных с энотической гибелью поглощенных клеток (ATG7, PIK3CR), вероятно, поглощенным клеткам удастся избежать клеточной гибели, или они погибают путем апоптоза. Также возможен вариант деления внутри клетки хозяина (Рисунок 5).

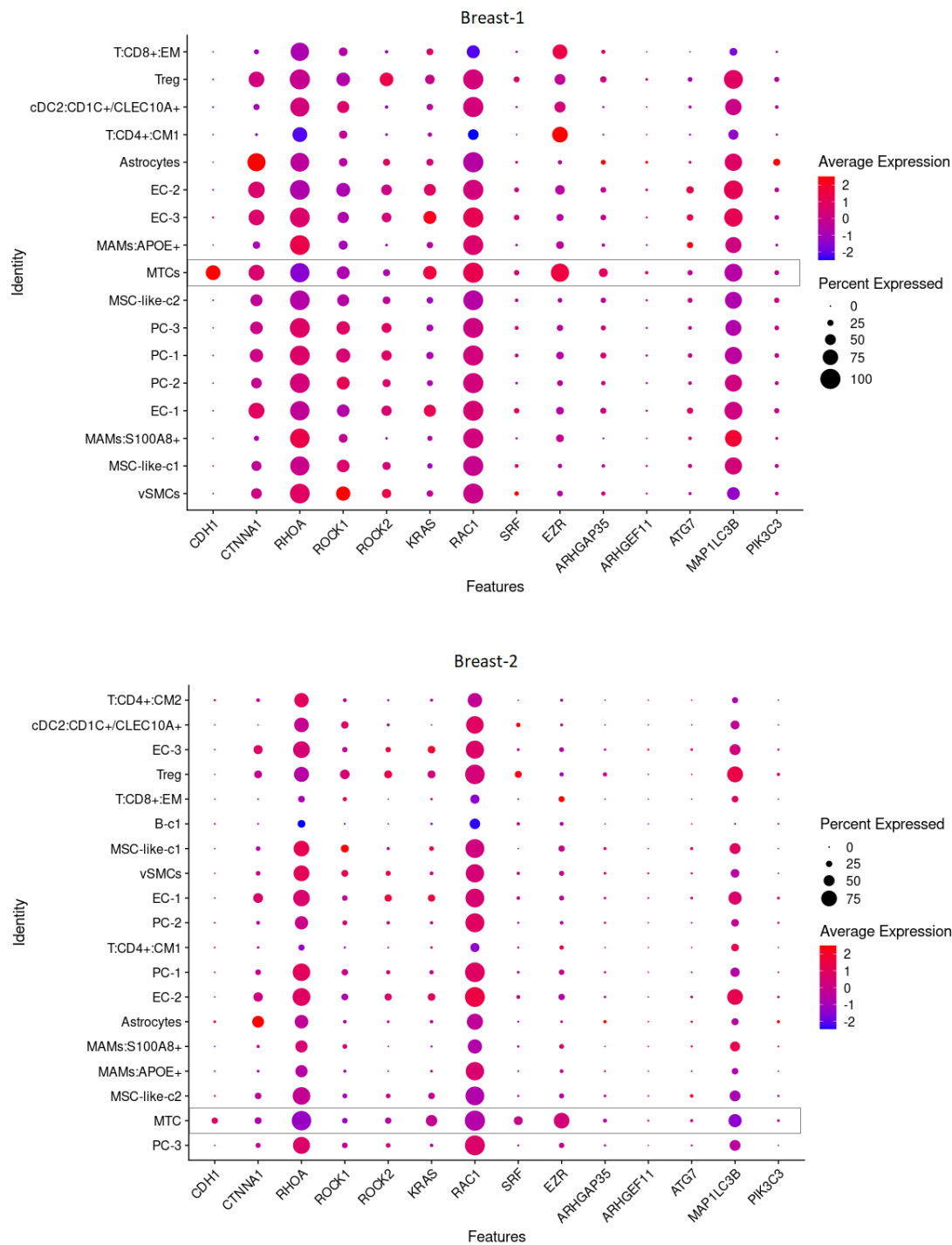


Рисунок 7 – Dot Plot экспрессии группы генов, связанных с энтозом и энтотической смертью, в образцах пациентов с первичной опухолью молочной железы

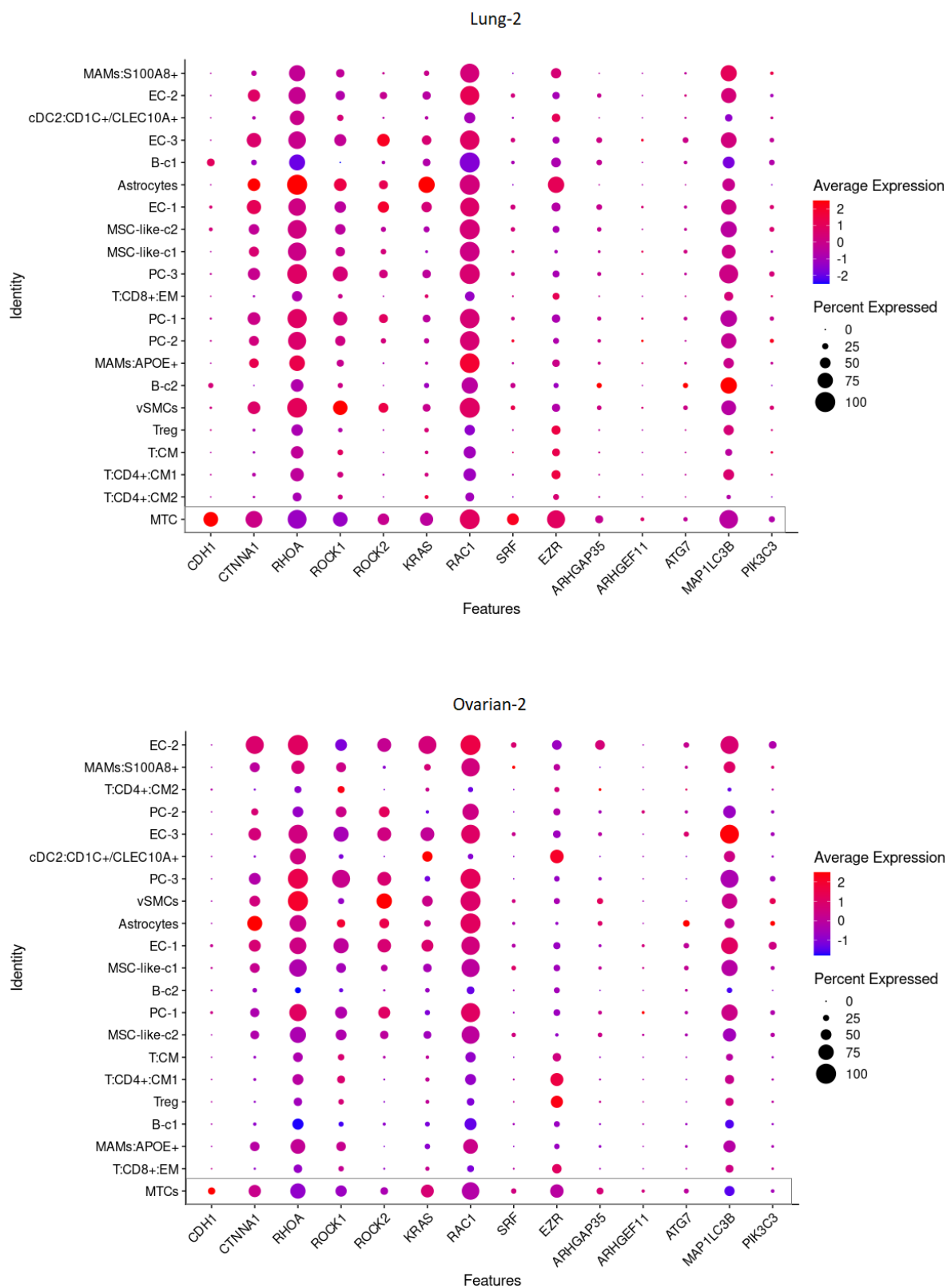


Рисунок 8 – Dot Plot экспрессии группы генов, связанных с энтозом и энтотической смертью, в образцах пациентов с первичным раком легкого и первичным раком яичников

Пироптоз и инфламмосомы

Пироптоз – это форма RCD, вызванная нарушениями внеклеточного или внутриклеточного гомеостаза, связанными с врожденным иммунитетом (например, при инвазии патогенов), которая проявляет специфические морфологические признаки, такие как конденсация хроматина, набухание клетки и проницаемость плазматической мембраны [36].

На молекулярном уровне пироптоз часто зависит от активации одной или нескольких воспалительных каспаз, у человека это каспазы CASP1, CASP3, CASP4 и CASP5. При активации каспаз выше определенного порога, они ускоряют пироптоз, катализируя протеолитическое расщепление гасдермина GSDMD [37, 38], который затем транслоцируется на внутреннюю часть плазматической мембраны и создает в ней поры. Помимо GSDMD, как следуют из литературных источников, поры могут образовывать и другие белки гасдермины, например GSDMDE (другое название – DFNA1) [21, 39]. В то время как при апоптозе воспалительные процессы ингибируются, пироптоз напротив характеризуется обязательным наличием воспаления.

Пироптозу предшествует сборка инфламмосомы, которая и приводит к активации каспазы. Инфламмосома – внутриклеточный мультибелковый комплекс, ответственный за активацию воспалительного ответа, который образуется в миелоидных клетках и играет важную роль во врожденном иммунитете. На сегодняшний день было охарактеризовано 12 различных инфламмасом: NLRP1, NLRP2, NLRP3, NLRP6, NLRP7, NLRP9, NLRP12, NLRC4/NAIP, AIM2, IFI16, CARD8, PYRIN [29]. Большинство сенсорных белков инфламмосомы принадлежат к семейству Nod-подобных рецепторов (Nod-like receptor, NLR), каждый из которых содержит домены:

- a. Центральным домен связывания нуклеотидов и олигомеризации (nucleotide-binding and oligomerization domain, NOD)
- b. С-концевой лейцин-богатый повтор (leucine-rich repeat, LRR)

Белки семейства NLR в свою очередь могут быть разделены на 4 подсемейства в зависимости от N-концевого домена:

- NLRA – содержат домен активации;
- NLRB – содержат домен бакуловирусного IAP-повтора (BIR);
- NLRC – содержат домен активации и рекрутирования каспаз (caspase activation and recruitment domain, CARD);
- NLRP – рецепторы, содержащие пириновый домен.

За исключением первого подсемейства, все NLR могут образовывать инфламмосомы. Не для всех инфламмосом механизмы их активации ясны. Однако, к примеру, было показано, что истощение АТФ, вызванное инфицированием *Toxoplasma gondii* или *Listeria monocytogenes* активирует NLRP1 инфламмосому [40]. Лиганды, которые ответственны за прямую активацию инфламмосомы NLRP3, до сих пор остаются неизвестными. NLRP3 активируется широким спектром PAMP (pathogen-associated molecular patterns) и DAMP, включая повреждения лизосом с высвобождением катепсинов, твердые частицы и кристаллы холестерина, клеточные метаболиты, дефектную митохондрию, ионные возмущения, такие как отток из клетки ионов K^+ , приток в клетку Ca^{2+} и другие сигналы.

Обнаружение экзогенных и/или эндогенных сигналов опасности рецептором NLRP3 приводит к формированию комплекса инфламмосомы и его активации. Сборка инфламмосомы приводит к зависимому от каспазы 1 высвобождению провоспалительных цитокинов IL-1 β и IL-18 и гибелью клеток пироптозом, опосредованной GSDMD (происходит не всегда).

Инфламмосомный комплекс NLRP3 состоит из рецептора NLRP3, адапторного белка PYCARD (ASC) и эффектора – каспазы 1. Под действием стимулов происходит олигомеризация домена через гомотипичные взаимодействия между ее центральными доменами NACHT. В таком состоянии сенсор рекрутирует PYCARD посредством гомотипичных взаимодействий PYD-PYD и образует зачатки образования спиральных

филаментов, которые также происходят посредством гомотипичных взаимодействий PYD-PYD. Множественные филаменты PYCARD сливаются в единый макромолекулярный фокус, известный как пятнышко ASC. Собранный PYCARD рекрутирует каспазу-1 посредством взаимодействий CARD-CARD и обеспечивает саморасщепление каспазы-1, индуцированное близостью каспаз и их активацию (Рисунок 9) [41].

Активация инфламмосомы – это воспалительный процесс, который должен жестко регулироваться. Поэтому предполагается, что, за немногими исключениями, активация инфламмосомы представляет собой двухэтапный процесс, включающий стадии подготовки и активации [41]. На стадии активации под действием различных сигналов (Рисунок 9) происходит усиление транскрипции компонентов инфламмосомы. В литературе есть данные, свидетельствующие о том, что HIF-1 α может модулировать активацию инфламмосомы [42]. Также стадия подготовки требует некоторых посттрансляционных модификаций NLRP3 [41].

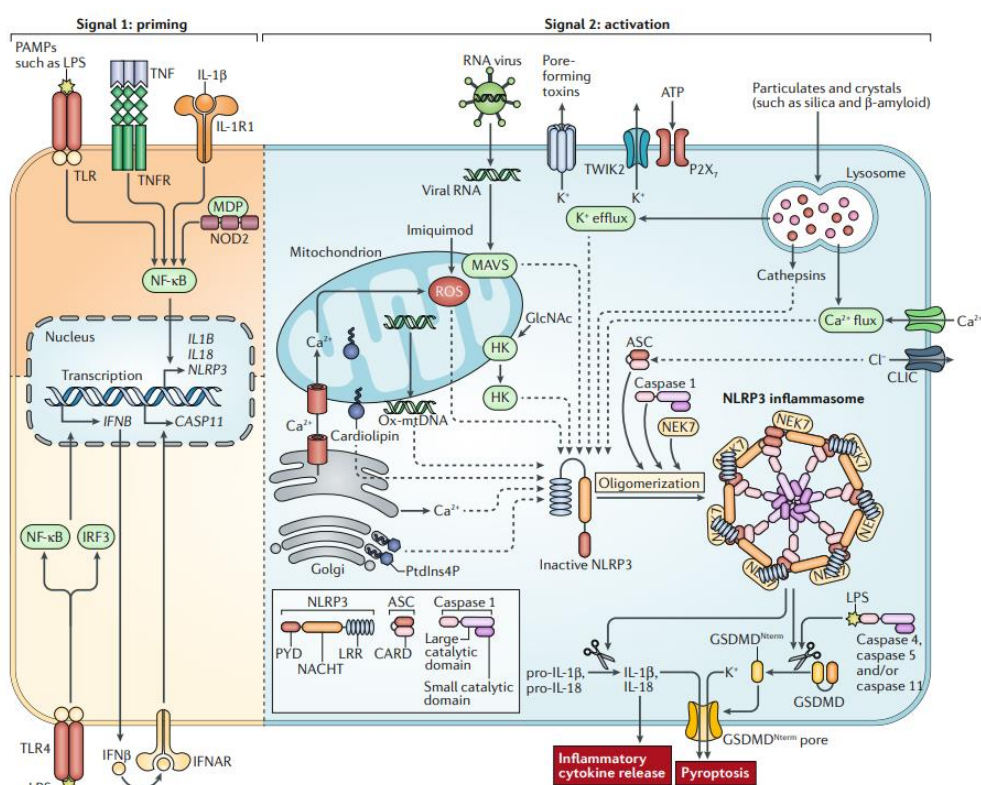


Рисунок 9 – Схема молекулярного механизма инициации и активации инфламмосомы

В каждом из образцов, за исключением образца Ovarian-2, обнаружены среди сверхэкспрессированных гены, кодирующие CASP1 (Таблица 6). Кроме того, можно заметить, что во всех трех образцах наблюдается дифференциальная экспрессия гена, кодирующего белок PYCARD в клетках фенотипа MAMs:APOE+. В MAMs:S100A8+ PYCARD дифференциально экспрессирован только в образцах рака груди. Также среди генов, дифференциально экспрессируемых макрофагами, можно заметить интерлейкины IL18, IL1B, а также рецепторы TLR2, TLR4.

Таблица 6 – Сверхэкспрессированные гены, задействованные в образовании инфламсом и пироптозе

Тип клеток	Breast-1	Breast-2	Lung-2	Ovarian-2
Astrocytes		NLRP1		
EC-1	GSDMD, CASP4	GSDMD, CASP4		
EC-2	GSDMD, CASP4	NLRP1, CASP4		
EC-3	GSDMD	NLRP1, CASP4		TLR4
MAMs:APOE+	CASP1, TREM2, PYCARD, IL18, IL1B, TLR4, TLR2, HIF1A, P2RX7	CASP1, TREM2, PYCARD, IL18, IL1B, TLR2, HIF1A	TREM2, PYCARD, NAIP, TLR4, TLR2	TREM2, NLRP3, NAIP, IL1B, IL18, TLR4, TLR2
MAMs:S100A8+	TREM2, NLRP3, PYCARD, NAIP, CASP1, IL18, IL1B, TLR2	CASP1, NLRP3, CASP4, PYCARD	TREM2, NAIP, IL1B, TLR2	TREM2, NLRP3, IL1B, TLR2
MSC-like-c1				TLR4
MSC-like-c2		CASP4	HIF1A	
MTCs	GSDMD			DHX9, GSDMD
PC-1		CASP4, HIF1A	HIF1A	HIF1A
PC-3		CASP4	HIF1A	
T:CD4+:CM1	CASP8	GZMA	CASP1, GZMB	
T:CD8+:EM	CASP8, GZMB, GZMA	GZMB, GZMA	GSDMD, GZMB, GZMA	GZMB, GZMA
cDC2:CD1C+/CLEC10A+	TREM2, CASP4, NLRP3, PYCARD, NAIP, CASP1, IL18, IL1B, TLR2	IL1B	AIM2	AIM2

Абберантная активация инфламмасом связана с развитием рака. Роль, которую играет передача сигналов воспаления, может отличаться в зависимости от типа рака, его этиологии, а также типа клеток, которые активируют инфламмасомный путь в микроокружении опухоли [39].

Роль инфламмасы в развитии рака часто опосредована IL-1 β , который продуцируют различные клетки опухоли, в том числе ассоциированные с опухолью макрофаги (tumor associated macrophages, TAMs) и ассоциированные с раком фибробласты (cancer-associated fibroblasts, CAFs) [39]. Механически, IL-1 β способствует прогрессированию опухоли и метастазированию, управляя иммуносупрессивным TME и индуцируя экспрессию молекул адгезии на эндотелиальных клетках [43]. Более того, было показано, что IL-1 β , опосредованный инфламмасомой Nlrp3, индуцирует продукцию цитокина IL-22 CD4⁺ Т клетками памяти, что способствует развитию рака. Также было показано, что помимо влияния на микроокружение, как фактор пролиферации действует аутокринная регуляция IL-1 β .

Кроме выживания и пролиферации злокачественных клеток, IL-1 β также поддерживает их миграцию и инвазию. Так, в модели колоректального рака было показано, что производимый макрофагами IL-1 β вызывает выработку сывороточного амилоида A1 (SAA1) клетками опухоли, создавая прямую обратную связь – повышается выработка макрофагами матриксной металлопротеиназы 9 MMP9, участвующей в ремоделировании межклеточного матрикса, что способствует миграции и образованию метастазов [39, 44].

Несмотря на значимую роль IL-1 β в процессах, способствующих развитию опухоли, могут существовать и альтернативные пути развития рака опосредованные инфламмосомой, с участием IL-18 [39].

При некоторых видах рака инфламмосомный путь способствует иммуносупрессии, поддерживая образование и рекрутирование миелоидных супрессорных клеток (MDSC) или индуцируя дифференцировку TAMs в

толерогенный фенотип. Ряд исследований подтверждает участие инфламмосомы NLRP3 в подавлении противоопухолевого иммунитета [39].

Иммуногенное перепрограммирование врожденного и адаптивного иммунитета в ТМЕ выявило важность передачи сигналов NLRP3 в первичных опухолях или клеток врожденного иммунитета в опосредовании уклонения от иммунного ответа, что не только способствует распространению рака, но также обеспечивает клоногенное выживание [45]. Среди инфильтрирующих опухоль иммунных клеток TAMs занимают центральное место в содействии как метастатическому распространению опухоли, так и уклонению от иммунитета [45,46]. С другой стороны, активация инфламмосомы усиливает опухолелитическую активность CD8⁺ Т-клеток и NK-клеток зависимым от IL-18 образом и дополнительно способствует противоопухолевому иммунитету посредством пироптоза, иммуногенной гибели клеток [39].

Можно увидеть, что в каждом из образцов наблюдается экспрессия NLRP3, и в большей степени она наблюдается в макрофагах MAMs:S100A8⁺. В образце Breast-1 экспрессия гена наблюдается примерно в 30-40% клетках, в образце Breast-2 примерно в 20%, а в Lung-2 в не более чем 10%, в Ovarian-2 примерно в 15%. При этом PYCARD экспрессируется в 50% и более процентах клеток во всех образцах в обоих фенотипов макрофагов, ровно как и IL1B в MAMs:S100A8⁺, при этом в популяции MAMs:APOE в большей доле клеток экспрессируется IL18. Доля клеток, экспрессирующих CASP1 почти что соотносится с долей клеток, экспрессирующих NLRP3. Также не до конца ясно, приводит ли образование инфламмосомы к пироптозу: белки газдермины не дифференциально экспрессированы в макрофагах и их экспрессия наблюдается также не более чем в 25% клеток.

Интересно, что в Lung-2 и Ovarian-2 наблюдается описанная в литературе цепочка: макрофаги вырабатывают IL-1 β , что вызывает выработку SAA1 клетками опухоли и повышает продуцирование макрофагами матриксной MMP9, участвующей в моделировании межклеточного матрикса. В литературе описана выработка SAA1 клетками легочных метастазов [47].

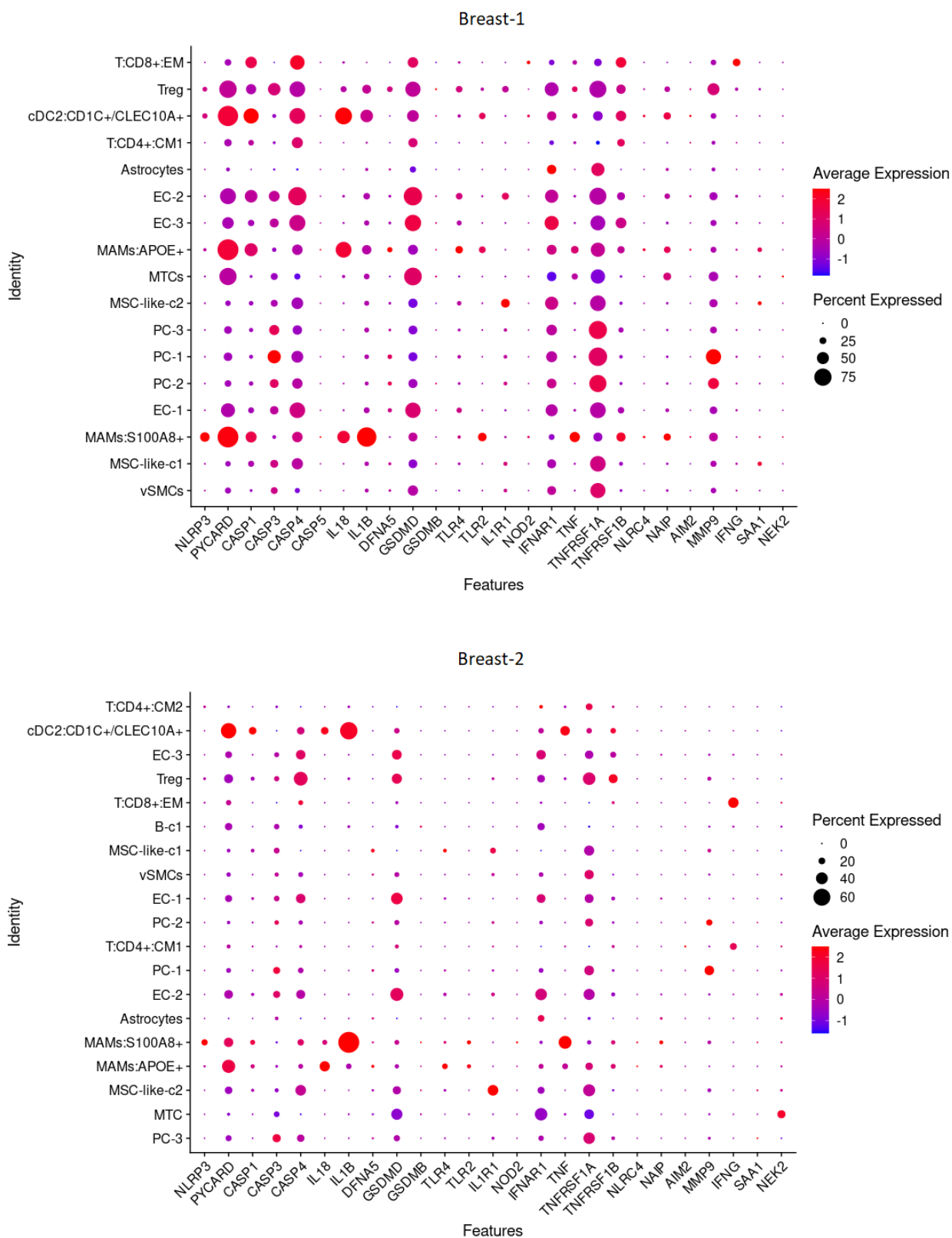


Рисунок 7 – Dot Plot экспрессии группы генов, связанных с инфламмасомой и пироптозом в образцах пациентов с первичным раком молочной железы

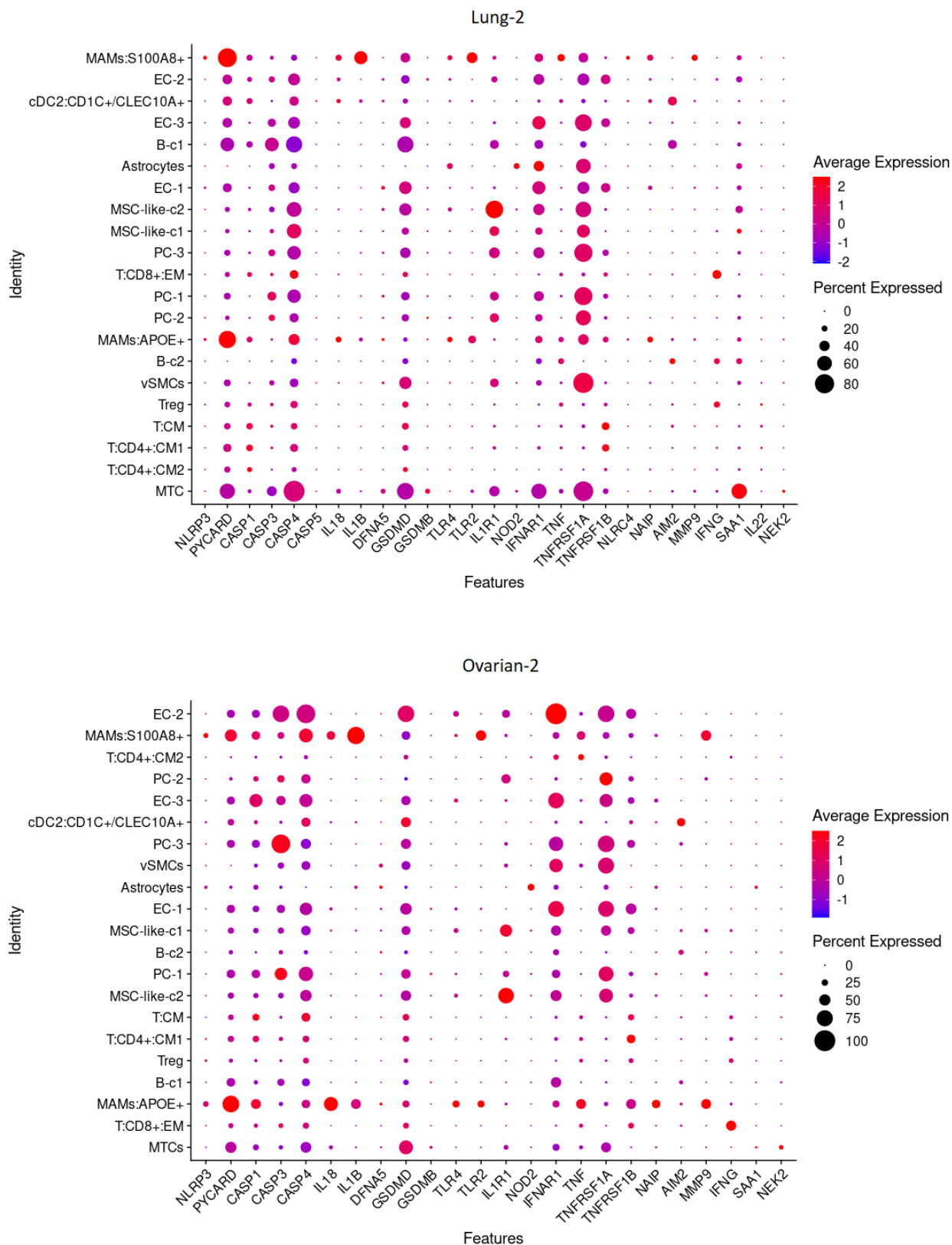


Рисунок 8 – Dot Plot экспрессии группы генов, связанных с инфламмасомой и пироптозом в образцах пациентов с первичным раком легкого и с первичным раком яичников

MIF и партанатос

Партанатос – это тип RCD, который инициируется гиперактивацией поли(АДФ-рибоза)-полимеразы 1 (PARP1), сенсором ДНК-повреждений, и ускоряется последующей биоэнергетической катастрофой, связанной с AIF-зависимой и MIF-зависимой деградацией ДНК [21]. Необходимо заметить, что партанатос возникает не только вследствие тяжелого или продолжительного алкилирующего повреждения ДНК, но и как ответ на оксидативный стресс, гипоксию, гипогликемию (пониженное состояние глюкозы) или признаки воспаления [21].

Гиперактивация PARP1 запускает высвобождение AIF (apoptosis-inducing factor 1, AIFM1) из митохондрий, при этом происходит взаимодействие фактора ингибирования миграции макрофагов (MIF) с AIFM1, которым он рекрутируется в ядро. В ядре MIF расщепляет ДНК на фрагменты, что приводит к гибели клеток [48]. Белки ADPRHL2 и RNF146 снижают уровень и доступность поли(АДФ-рибозы), соответственно, тем самым предотвращая высвобождение AIFM1 из митохондрий и дальнейшую гибель путем партанатоса [21, 49-50]. Также в партанатосе может принимать участие гексокиназа-1 (HK1). Связывание HK1 с полимерами поли(АДФ-рибозы) ингибирует гликолиз, что вызывает биоэнергетический коллапс, ускоряющий регулируемую клеточную смерть [51].

Заметим, что MIF дифференциально экспрессирован в метастатических клетках всех 4-х образцов (Таблица 7), однако дифференциальная экспрессия AIFM1 наблюдается лишь в образце Breast-1, а PARP1 – в образцах Breast-2 и Ovarian-2. При этом, в образце Ovarian-2 дифференциально экспрессирован ADPRHL2, который негативно влияет на возникновение партанатоса. Также, в Breast-2 и Lung-2 в 50% и 70% клеток популяции MTCs, соответственно, наблюдается экспрессия HK1. Хотя в Lung-2 PARP1 и AIFM1 не сверхэкспрессированы в MTCs по сравнению с другими клетками, в части клеток они экспрессируются.

Таким образом можно предположить, что часть популяции метастатических клеток может подвергаться партанатосу в каждом из образцов, при этом в образце Ovarian-2 действуют факторы, препятствующие этому механизму клеточной гибели.

Таблица 7 – Сверхэкспрессированные гены, задействованные в пути Parthanatos

Тип клеток	Breast-1	Breast-2	Lung-2	Ovarian-2
Astrocytes		MIF		
EC-2				RNF146
MSC-like-c1			MIF	
MSC-like-c2			MIF	RNF146
MTCs	AIFM1, MIF	MIF, PARP1	MIF	MIF, ADPRHL2, PARP1
PC-1				RNF146

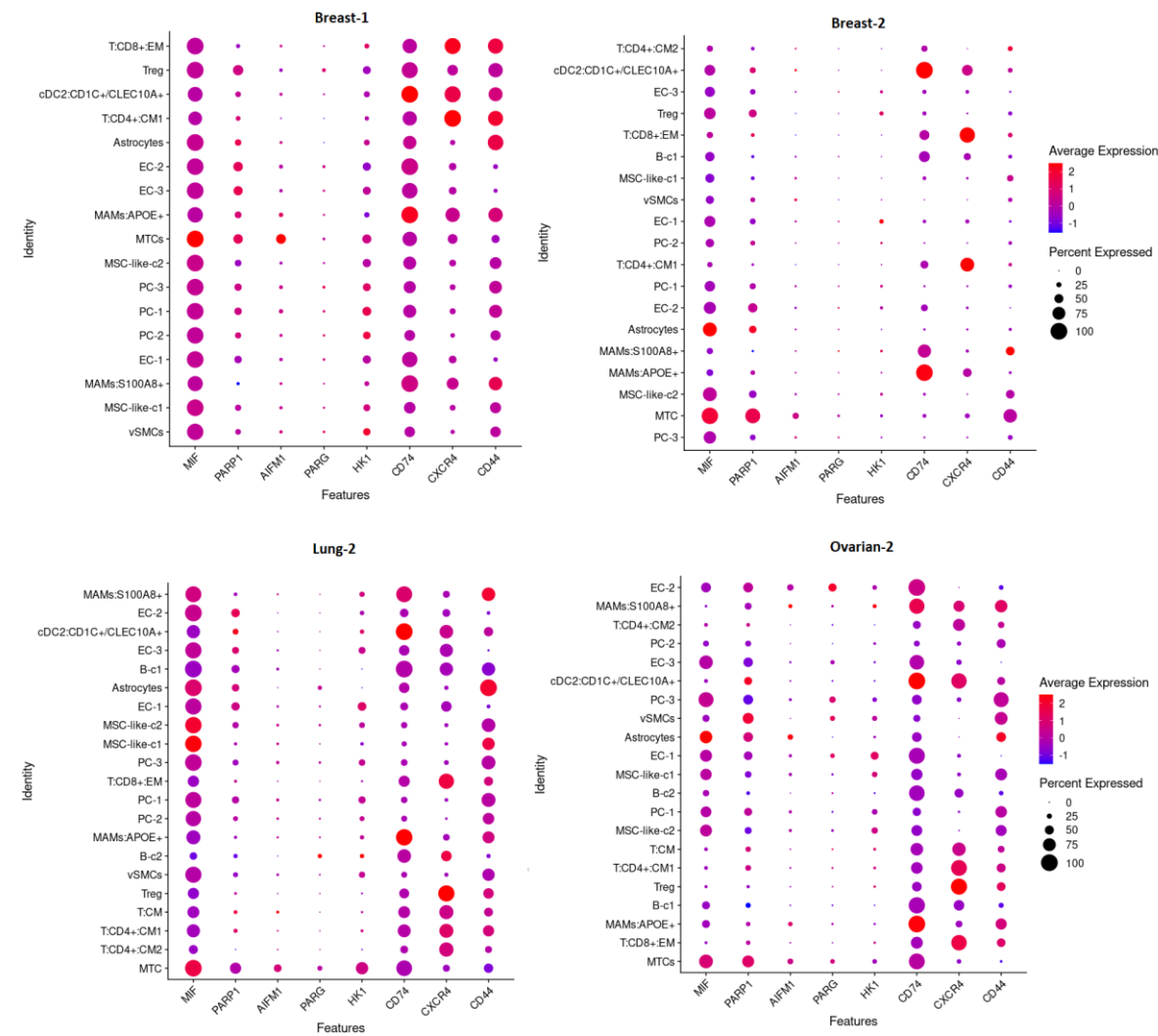


Рисунок 9 – DotPlot экспрессии генов, связанных с партанатосом и другими путями MIF

Однако помимо участия в партанатозе, MIF задействован и в других внутриклеточных и внеклеточных молекулярных процессах, важных для поддержания гомеостаза таких как стимулирование выживания клеток, передача сигналов антиоксидантов и заживление ран [48].

На сегодняшний день установлено, что MIF может экспрессироваться практически каждым типом иммунных клеток, а также его сверхэкспрессия обнаружена в большинстве солидных и гематогенных злокачественных опухолей [52], при это он выступает негативным прогностическим маркером в ряде типов рака [53]. MIF взаимодействует как с белками клеточной поверхности, так и с внутриклеточными белками. Связывание MIF трансмембранных рецепторов приводит к запуску каскадов внутриклеточной передачи сигнала в паракринной или аутокринной манере [52, 54]. Можно выделить следующие варианты взаимодействия MIF с поверхностными рецепторами:

- Связывание цитокина MIF с CD74, связанный CD74 формирует гетерокомплекс с CD44, что позволяет активировать каноничный путь MAPK/ERK (Рисунок 10).
- MIF выступает неродственным лигандом для хемокиновых рецепторов CXCR2, CXCR4, CXCR7 (Рисунок 10) [52]

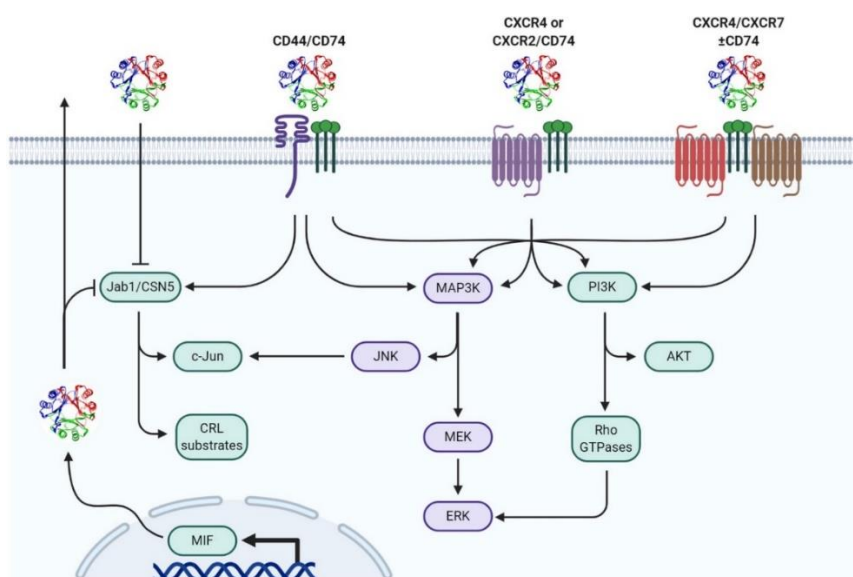


Рисунок 10 – Механизмы передачи сигнала от MIF [52]

Анализ межклеточных взаимодействий в CellChat показал наличие в каждом из образцов взаимодействий лиганд-рецептор, в котором лигандом выступал MIF (Таблица 8). Отбирались взаимодействия на уровне значимости $\alpha = 0.001$. Видно, что источником MIF выступают не только метастатические клетки и клетки иммунной системы, но также и эндотелиальные клетки, перициты и MSC-like-клетки.

Таблица 8 – Результаты CellChat

source	target	interaction_name_2	pathway_name	evidence
MTCs	MAMs:APOE+	MIF - (CD74+CXCR4)	MIF	PMID: 29637711; PMID: 24760155
MSC-like-c1	T:CD4+:CM1	MIF - (CD74+CXCR4)	MIF	PMID: 29637711; PMID: 24760155
EC-1	T:CD4+:CM1	MIF - (CD74+CXCR4)	MIF	PMID: 29637711; PMID: 24760155
PC-1	T:CD4+:CM1	MIF - (CD74+CXCR4)	MIF	PMID: 29637711; PMID: 24760155
MSC-like-c2	T:CD4+:CM1	MIF - (CD74+CXCR4)	MIF	PMID: 29637711; PMID: 24760155
MTCs	T:CD4+:CM1	MIF - (CD74+CXCR4)	MIF	PMID: 29637711; PMID: 24760155
MSC-like-c1	cDC2:CD1C+/CLEC10A+	MIF - (CD74+CXCR4)	MIF	PMID: 29637711; PMID: 24760155
MSC-like-c2	cDC2:CD1C+/CLEC10A+	MIF - (CD74+CXCR4)	MIF	PMID: 29637711; PMID: 24760155
MTCs	cDC2:CD1C+/CLEC10A+	MIF - (CD74+CXCR4)	MIF	PMID: 29637711; PMID: 24760155
MSC-like-c1	Treg	MIF - (CD74+CXCR4)	MIF	PMID: 29637711; PMID: 24760155
PC-1	Treg	MIF - (CD74+CXCR4)	MIF	PMID: 29637711; PMID: 24760155
PC-1	T:CD8+:EM	MIF - (CD74+CXCR4)	MIF	PMID: 29637711; PMID: 24760155
PC-1	MAMs:S100A8+	MIF - (CD74+CD44)	MIF	PMID: 29637711; PMID: 26175090
MTCs	MAMs:S100A8+	MIF - (CD74+CD44)	MIF	PMID: 29637711; PMID: 26175090
PC-1	MAMs:APOE+	MIF - (CD74+CD44)	MIF	PMID: 29637711; PMID: 26175090
MSC-like-c2	MAMs:APOE+	MIF - (CD74+CD44)	MIF	PMID: 29637711; PMID: 26175090
MTCs	MAMs:APOE+	MIF - (CD74+CD44)	MIF	PMID: 29637711; PMID: 26175090
MSC-like-c1	T:CD4+:CM1	MIF - (CD74+CD44)	MIF	PMID: 29637711; PMID: 26175090
EC-1	T:CD4+:CM1	MIF - (CD74+CD44)	MIF	PMID: 29637711; PMID: 26175090
PC-1	T:CD4+:CM1	MIF - (CD74+CD44)	MIF	PMID: 29637711; PMID: 26175090
MSC-like-c2	T:CD4+:CM1	MIF - (CD74+CD44)	MIF	PMID: 29637711; PMID: 26175090
MTCs	T:CD4+:CM1	MIF - (CD74+CD44)	MIF	PMID: 29637711; PMID: 26175090
MAMs:APOE+	T:CD4+:CM1	MIF - (CD74+CD44)	MIF	PMID: 29637711; PMID: 26175090
MSC-like-c2	cDC2:CD1C+/CLEC10A+	MIF - (CD74+CD44)	MIF	PMID: 29637711; PMID: 26175090
MTCs	cDC2:CD1C+/CLEC10A+	MIF - (CD74+CD44)	MIF	PMID: 29637711; PMID: 26175090
MSC-like-c1	Treg	MIF - (CD74+CD44)	MIF	PMID: 29637711; PMID: 26175090
PC-1	Treg	MIF - (CD74+CD44)	MIF	PMID: 29637711; PMID: 26175090

На рисунке 11 приведен пример карты взаимодействий лиганд-рецептор для образца Breast-1, где в качестве клеток-источников лигандов выступают метастатические клетки. Каждый столбец карты соответствует

взаимодействию между конкретными популяциями клеток, а каждая строка – паре лиганд-рецептор. Такие карты были построены для всех образцов для каждого клеточного типа, при условии, что численность его популяции ≥ 10 .

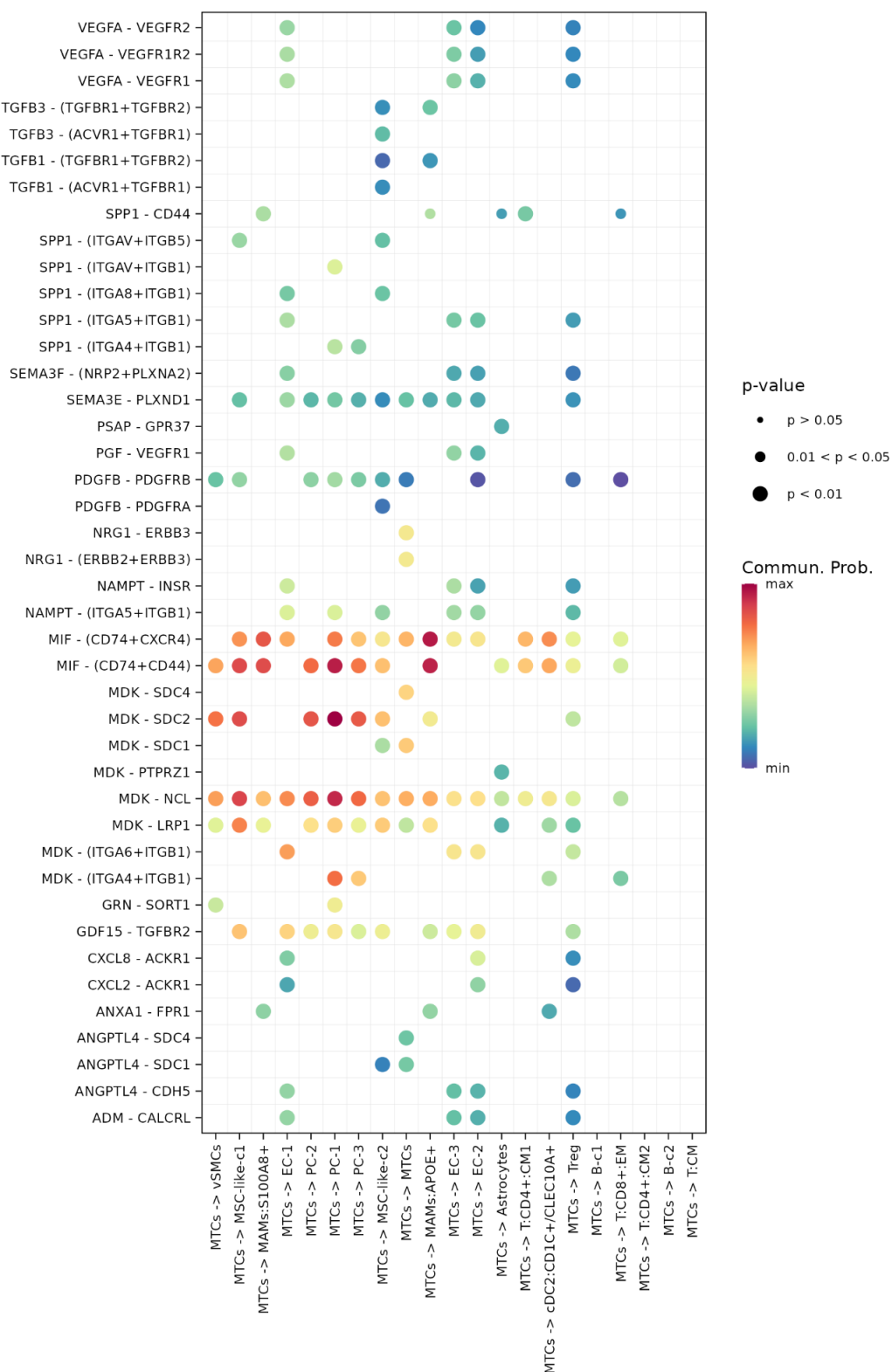


Рисунок 11 – BubbleMap взаимодействий лиганд-рецептор в образце Breast-1 для метастатических клеток-источников

Проанализируем полученные взаимодействия лиганда MIF с трансмембранными рецепторами, в зависимости от типов взаимодействующих клеток.

- MAMs

Первые исследования показывали, что MIF опухолевого происхождения, действующий паракринно отвечает за инициацию зависимого от моноцитов/макрофагов ангиогенеза и за последующую прогрессию опухоли [56]. Позже появилось доказательство того, что MIF, происходящий из макрофагов, может играть доминирующую функциональную роль в поляризации макрофагов в M2 [57].

- cDC2:CD1C+/CLEC10A+

Дендритные клетки (dendritic cells, DCs) – профессиональные антигенпрезентирующие клетки (АПК), которые могут либо способствовать противоопухолевому иммунитету посредством презентации опухолеассоциированных антигенов (ОАА), либо обеспечивать толерантность к противоопухолевым иммунным ответам, стимулируя анергию Т-клеток [55]. В нескольких исследованиях, в которых изучают потенциальную роль MIF в DCs-зависимом противоопухолевом иммунитете, предполагается, что MIF функционально ухудшает способность DCs представлять ОАА Т-клеткам, что приводит к ослаблению противоопухолевого ответа.

Дендритные клетки представляют антигены CD4+ Т-клеткам через МНС-II или перекрестно представляют антигены CD8+ Т-клеткам через МНС-I. Было показано, что MIF способствует иммуносупрессии частично за счет подавления перекрестной презентации опухолевых антигенов дендритными клетками [52]. Есть свидетельство того, что MIF может нарушать представление опухолевого антигена CD4+ Т-клеткам. Таким образом, вероятно MIF способствует уклонению иммунитета связанному с опухолью, путем ингибирования инфильтрации дендритных клеток, созревания и презентации антигена [52].

- Т-лимфоциты

Treg проникают в строму опухоли и дренирующие опухоль лимфатические узлы и сильно подавляют противоопухолевый иммунитет за счет ингибирования IL-2, секретирования иммуносупрессивных цитокинов, таких как IL-10, IL-35, TGF- β . Еще одним супрессивным механизмом является CTLA-4-зависимое подавление CD80 и CD86 на антиген-презентирующих клетках, что приводит к анергии Т-клеток и прямому лизису эффекторных Т-клеток путем перфорин-зависимой цитотоксичности [52]. Предполагается, что MIF регулирует Treg посредством экспансии.

Заключение

В результате выполнения курсовой работы были освоены первичная обработка и классический анализ данных scRNA-seq с помощью пакета Seurat. По маркерным генам из исходной статьи была проведена менее детальная аннотация, чем в исходной работе, с целью освоения навыков, необходимых для дальнейшего анализа новых образцов, для которых аннотация отсутствует.

С помощью пакета CellChat для R были найдены различные пары взаимодействий между всеми типами клеток в каждом из образцов. Было установлено, что в каждом из 4-х образцов активны взаимодействия, в которых лигандом выступает MIF. Интересно, что MIF не только является игроком в таком механизме клеточной смерти, как пиртанатоз, но и, взаимодействуя с различными иммунными клетками микроокружения опухоли, в большинстве случаев способствует прогрессированию опухоли и избеганию ею иммунного ответа.

С помощью Seurat в каждом типе клеток были найдены дифференциально экспрессированные по сравнению с другими типами клеток гены. Среди них были найдены гены, участвующие в механизмах клеточной смерти. Первичный анализ находок, «лежащих на поверхности», показал, что в метастатических клетках активны гены, задействованные в энтотической гибели клеток. Сложно судить о том, происходит ли наверняка клеточная гибель клетки, в результате ее поглощения клеткой-соседом, однако в литературе показано, что само явление энтоза между опухолевыми клетками способно способствовать онкогенезу. Кроме того, в обоих фенотипах макрофагах и дендритных клетках были дифференциально экспрессированы гены, связанные с пироптозом. Такой клеточной смерти подвержены клетки моноцитарного происхождения, пироптоз возникает вследствие активации инфламмосомы и характеризуется воспалением. Опять же, с полной уверенностью утверждать о наличии пироптоза с клеточной гибелью сложно, поскольку в клетках не наблюдался высокий уровень экспрессии газдерминов и в некоторых образцах наблюдался в малом числе клеток. Однако сама по

себе активация инфламмосомы свидетельствует о воспалении и ее aberrantная активность часто способствует прогрессированию опухоли.

В дальнейшем планируется подробнее проанализировать найденные пары рецептор, которые, возможно, были найдены не во всех образцах, но соответствуют взаимодействию между клетками иммунной системы, которое может быть связано с описанным ранее «братоубийством». Также планируется изучать не только образцы метастазов, но и первичные опухоли.

Список литературных источников

1. Nandigama R, Upcin B, Aktas BH, Ergün S, Henke E. Restriction of drug transport by the tumor environment. *Histochem Cell Biol*. 2018 Dec;150(6):631-648. doi: 10.1007/s00418-018-1744-z. Epub 2018 Oct 25. PMID: 30361778.
2. Laplane L, Duluc D, Larmonier N, Pradeu T, Bikfalvi A. The Multiple Layers of the Tumor Environment. *Trends Cancer*. 2018 Dec;4(12):802-809. doi: 10.1016/j.trecan.2018.10.002. Epub 2018 Oct 24. PMID: 30470302.
3. Gratchev A.N., Samoilova D.V., Rashidova M.A., Petrenko A.A., Kovaleva O.V. Tumor associated macrophages: current research and perspectives of clinical use. *Advances in Molecular Oncology*. 2018;5(4):20-28. (In Russ.) <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2018-5-4-20-28>
4. Gocheva V, Wang HW, Gadea BB, Shree T, Hunter KE, Garfall AL, et al. IL-4 induces cathepsin protease activity in tumor-associated macrophages to promote cancer growth and invasion. *Genes Dev* (2010) 24:241–55. doi: 10.1101/gad.1874010
5. Lin EY, Nguyen AV, Russell RG, Pollard JW. Colony-stimulating factor 1 promotes progression of mammary tumors to malignancy. *J Exp Med* (2001) 193:727–40. doi: 10.1084/jem.193.6.727
6. Qian BZ, Pollard JW. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell* (2010) 141:39–51. doi: 10.1016/j.cell.2010.03.014
7. Daley D, Mani VR, Mohan N, Akkad N, Pandian G, Savadkar S, et al. NLRP3 signaling drives macrophage-induced adaptive immune suppression in pancreatic carcinoma. *J Exp Med* (2017) 214:1711–24. doi: 10.1084/jem.20161707
8. Herbert A. Contextual Cell Death in Adaptive Immunity: Selecting a Winning Response. *Front Immunol*. 2019;10:2898. Published 2019 Dec 17. doi:10.3389/fimmu.2019.02898
9. Hu P, Zhang W, Xin H, Deng G. Single Cell Isolation and Analysis. *Front Cell Dev Biol*. 2016;4:116. Published 2016 Oct 25. doi:10.3389/fcell.2016.00116

10. Tang, X., Huang, Y., Lei, J. *et al.* The single-cell sequencing: new developments and medical applications. *Cell Biosci* **9**, 53 (2019).
<https://doi.org/10.1186/s13578-019-0314-y>
11. Chen G, Ning B, Shi T. Single-Cell RNA-Seq Technologies and Related Computational Data Analysis. *Front Genet.* 2019 Apr 5;10:317. doi: 10.3389/fgene.2019.00317. PMID: 31024627; PMCID: PMC6460256.
12. Labib, M., Kelley, S.O. Single-cell analysis targeting the proteome. *Nat Rev Chem* **4**, 143–158 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41570-020-0162-7>
13. Adil A, Kumar V, Jan AT, Asger M. Single-Cell Transcriptomics: Current Methods and Challenges in Data Acquisition and Analysis. *Front Neurosci.* 2021 Apr 22;15:591122. doi: 10.3389/fnins.2021.591122. PMID: 33967674; PMCID: PMC8100238.
14. Gonzalez, Hugo et al., Cellular Architecture of Human Brain Metastases. Available at SSRN: <https://ssrn.com/abstract=3883639> or <http://dx.doi.org/10.2139/ssrn.3883639>
15. Seurat. Getting Started with Seurat. URL: https://satijalab.org/seurat/articles/get_started.html (Дата обращения: 05.05.2022)
16. Armingol, E., Officer, A., Harismendy, O. *et al.* Deciphering cell–cell interactions and communication from gene expression. *Nat Rev Genet* **22**, 71–88 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41576-020-00292-x>
17. Jin, S., Guerrero-Juarez, C.F., Zhang, L. *et al.* Inference and analysis of cell-cell communication using CellChat. *Nat Commun* **12**, 1088 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21246-9>
18. KEGG PATHWAY Database. URL: <https://www.kegg.jp/kegg/pathway.html> (Дата обращения: 08.06.2022)
19. Gene Ontology Resource. URL: <http://geneontology.org/> (Дата обращения: 08.06.2022)
20. 10x Genomics. URL <https://www.10xgenomics.com/> Дата обращения: (18.06.2022)

21. Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S. *et al.* Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ* **25**, 486–541 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41418-017-0012-4>.
22. Krishna S, et al. Mechanisms and consequences of entosis. *Cell Mol Life Sci.* 2016;73:2379–86.
23. Florey O, et al. Entosis: cell-in-cell formation that kills through entotic cell death. *Curr Mol Med.* 2015;15:861–6.
24. Overholtzer M, Mailleux AA, Mouneimne G, Normand G, Schnitt SJ, King RW, Cibas ES, Brugge JS (2007) A nonapoptotic cell death process, entosis, that occurs by cell-in-cell invasion. *Cell* 131:966–979.
25. Sun Q, Cibas ES, Huang H, Hodgson L, Overholtzer M (2014) Induction of entosis by epithelial cadherin expression. *Cell Res* 24:1288–1298.
26. Purvanov V, Holst M, Khan J, Baarlink C, Grosse R (2014) G-protein-coupled receptor signaling and polarized actin dynamics drive cell-in-cell invasion. *Elife* 3.
27. Wan Q, Liu J, Zheng Z, Zhu H, Chu X, Dong Z, Huang S, Du Q (2012) Regulation of myosin activation during cell-cell contact formation by Par3-Lgl antagonism: entosis without matrix detachment. *Mol Biol Cell* 23:2076–2091.
28. Florey O, et al. Autophagy machinery mediates macroendocytic processing and entotic cell death by targeting single membranes. *Nat Cell Biol.* 2011;13:1335–43.
29. The Human Protein Atlas. URL: <https://www.proteinatlas.org/>
30. Krajcovic M, Johnson NB, Sun Q, Normand G, Hoover N, Yao E, Richardson AL, King RW, Cibas ES, Schnitt SJ, Brugge JS, Overholtzer M (2011) A non-genetic route to aneuploidy in human cancers. *Nat Cell Biol* 13:324–330.
31. Fujiwara T, Bandi M, Nitta M, Ivanova EV, Bronson RT, Pellman D (2005) Cytokinesis failure generating tetraploids promotes tumorigenesis in p53-null cells. *Nature* 437:1043–1047.
32. Krajcovic M, Krishna S, Akkari L, Joyce JA, Overholtzer M (2013) mTOR regulates phagosome and entotic vacuole fission. *Mol Biol Cell* 24:3736–3745.

- 33.Schwegler M, Wirsing AM, Schenker HM, Ott L, Ries JM, Buttner-Herold M, Fietkau R, Putz F, Distel LV (2015) Prognostic value of homotypic cell Internalization by nonprofessional phagocytic cancer cells. *BioMed Res Int* 2015:359392.
- 34.Sun Q, Luo T, Ren Y, Florey O, Shirasawa S, Sasazuki T, Robinson DN, Overholtzer M (2014) Competition between human cells by entosis. *Cell Res* 24:1299–1310.
- 35.Ward KA, Li WI, Zimmer S, Davis T (1991) Viscoelastic properties of transformed cells: role in tumor cell progression and metastasis formation. *Biorheology* 28:301–313.
- 36.Jorgensen I, et al. Pyroptotic cell death defends against intracellular pathogens. *Immunol Rev.* 2015;265:130–42.
- 37.Shi J, et al. Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death. *Nature.* 2015;526:660–5.
- 38.Qiu S, et al. 'Hints' in the killer protein gasdermin D: unveiling the secrets of gasdermins driving cell death. *Cell Death Differ.* 2017;24:588–96.
- 39.Lillo S, Saleh M. Inflammasomes in Cancer Progression and Anti-Tumor Immunity. *Front Cell Dev Biol.* 2022 Apr 20;10:839041. doi: 10.3389/fcell.2022.839041. PMID: 35517498; PMCID: PMC9065266.
- 40.Neiman-Zenevich, J., Stuart, S., Abdel-Nour, M., Girardin, S. E., and Mogridge, J. (2017). *Listeria Monocytogenes* and *Shigella Flexneri* Activate the NLRP1B Inflammasome. *Infect. Immun.* 85, e00338–17. doi:10.1128/IAI.00338-17
- 41.Swanson, K.V., Deng, M. & Ting, J.PY. The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics. *Nat Rev Immunol* **19**, 477–489 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0165-0>
- 42.Huang, J., Xia, J., Huang, L., & Li, Y. (2019). HIF-1 α promotes NLRP3 inflammasome activation in bleomycin-induced acute lung injury. *Molecular Medicine Reports*, 20, 3424-3432. <https://doi.org/10.3892/mmr.2019.10575>
- 43.Ershaid, N., Sharon, Y., Doron, H., Raz, Y., Shani, O., Cohen, N., et al. (2019). NLRP3 Inflammasome in Fibroblasts Links Tissue Damage with Inflammation

- in Breast Cancer Progression and Metastasis. *Nat. Commun.* 10, 4375. doi:10.1038/s41467-019-12370-8
- 44.Sudo, G., Aoki, H., Yamamoto, E., Takasawa, A., Niinuma, T., Yoshido, A., et al. (2021). Activated Macrophages Promote Invasion by Early Colorectal Cancer via an Interleukin 1 β -serum Amyloid A1 axis. *Cancer Sci.* 112, 4151–4165. doi:10.1111/cas.15080
 - 45.Moossavi, M., Parsamanesh, N., Bahrami, A. *et al.* Role of the NLRP3 inflammasome in cancer. *Mol Cancer* **17**, 158 (2018). <https://doi.org/10.1186/s12943-018-0900-3>
 - 46.Weichand B, Popp R, Dziumbila S, Mora J, Strack E, Elwakeel E, et al. S1PR1 on tumor-associated macrophages promotes lymphangiogenesis and metastasis via NLRP3/IL-1beta. *J Exp Med* (2017) 214:2695–713. doi: 10.1084/jem.20160392, 26.
 - 47.Hozhabri H, Ghasemi Dehkohne RS, Razavi SM, Razavi SM, Salarian F, Rasouli A, Azami J, Ghasemi Shiran M, Kardan Z, Farrokhzad N, Mikaeili Namini A, Salari A. Comparative analysis of protein-protein interaction networks in metastatic breast cancer. *PLoS One.* 2022 Jan 19;17(1):e0260584. doi: 10.1371/journal.pone.0260584. PMID: 35045088; PMCID: PMC8769308.
 - 48.Song, S., Xiao, Z., Dekker, F.J. *et al.* Macrophage migration inhibitory factor family proteins are multitasking cytokines in tissue injury. *Cell. Mol. Life Sci.* **79**, 105 (2022). <https://doi.org/10.1007/s00018-021-04038-8>
 - 49.Andrabi SA, et al. Iduna protects the brain from glutamate excitotoxicity and stroke by interfering with poly(ADP-ribose) polymer-induced cell death. *Nat Med.* 2011;17:692–9.
 - 50.Mashimo M, et al. ADP-ribosyl-acceptor hydrolase 3 regulates poly (ADP-ribose) degradation and cell death during oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110:18964–9.
 - 51.Fouquerel E, et al. ARTD1/PARP1 negatively regulates glycolysis by inhibiting hexokinase 1 independent of NAD⁺ depletion. *Cell Rep.* 2014;8:1819–31.

- 52.Noë JT, Mitchell RA. MIF-Dependent Control of Tumor Immunity. *Front Immunol.* 2020;11:609948. Published 2020 Nov 25. doi:10.3389/fimmu.2020.609948
- 53.Lippitz BE. Cytokine patterns in patients with cancer: a systematic review. *Lancet Oncol* (2013) 14:e218–228. doi: 10.1016/S1470-2045(12)70582-X
- 54.Fukuzawa J, Nishihira J, Hasebe N, Haneda T, Osaki J, Saito T, et al. Contribution of macrophage migration inhibitory factor to extracellular signal-regulated kinase activation by oxidative stress in cardiomyocytes. *J Biol Chem* (2002) 277:24889–95. doi: 10.1074/jbc.M112054200
- 55.Wculek SK, Cueto FJ, Mujal AM, Melero I, Krummel MF, Sancho D. Dendritic cells in cancer immunology and immunotherapy. *Nat Rev Immunol* (2020) 20:7–24. doi: 10.1038/s41577-019-0210-z
- 56.White ES, Strom SR, Wys NL, Arenberg DA. Non-small cell lung cancer cells induce monocytes to increase expression of angiogenic activity. *J Immunol* (2001) 166:7549–55. doi: 10.4049/jimmunol.166.12.7549
57. Wang X, Chen T, Leng L, Fan J, Cao K, Duan Z, et al. MIF produced by bone marrow-derived macrophages contributes to teratoma progression after embryonic stem cell transplantation. *Cancer Res* (2012) 72:2867–78. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-3247

Приложение

Таблица 1 – Состав клеточной популяции образцов рака груди

	Breast-1		Breast-2		Breast-3	
Тип клеток	Число	Процент	Число	Процент	Число	Процент
Astrocytes	27	0.44%	136	1.78%	21	0.22%
B-c1	7	0.11%	40	0.52%	1	0.01%
B-c2	1	0.02%	-	-	-	-
EC-1	430	6.94%	267	3.5%	21	0.22%
EC-2	138	2.23%	94	1.23%	4	0.04%
EC-3	148	2.39%	98	1.28%	4	0.04%
MAMs:APOE+	466	7.52%	409	5.35%	36	0.38%
MAMs:S100A8+	332	5.36%	143	1.87%	17	0.18%
MSC-like-c1	929	14.99%	12	0.16%	-	-
MSC-like-c2	250	4.03%	113	1.48%	3	0.03%
MTCs	372	6%	4929	64.52%	9218	98.42%
PC-1	1187	19.16%	635	8.31%	1	0.01%
PC-2	684	11.04%	357	4.67%	2	0.02%
PC-3	551	8.89%	132	1.73%	1	0.01%
T:CD4+:CM1	108	1.74%	53	0.69%	7	0.07%
T:CD4+:CM2	9	0.15%	25	0.33%	5	0.05%
T:CD8+:EM	21	0.34%	55	0.72%	8	0.09%
T:CM	1	0.02%	-	-	-	-
Treg	46	0.74%	21	0.27%	16	0.17%
cDC2:CD1C+/CLEC10A+	123	1.99%	13	0.17%	1	0.01%
vSMCs	366	5.91%	107	1.4%	-	-

Таблица 2 – Состав клеточной популяции образцов рака легкого, рака яичников и меланомы

	Lung-2		Ovarian-2	
Тип клеток	Число	Процент	Число	Процент
Astrocytes	5	0.18%	11	0.22%
B-c1	9	0.32%	170	3.33%
B-c2	5	0.18%	42	0.82%
EC-1	87	3.14%	23	0.45%

EC-2	19	0.69%	9	0.18%
EC-3	30	1.08%	15	0.29%
MAMs:APOE+	46	1.66%	14	0.27%
MAMs:S100A8+	19	0.69%	11	0.22%
MSC-like-c1	54	1.95%	29	0.57%
MSC-like-c2	86	3.1%	103	2.02%
MTCs	1015	36.6%	3926	76.95%
PC-1	217	7.83%	39	0.76%
PC-2	149	5.37%	10	0.2%
PC-3	95	3.43%	9	0.18%
T:CD4+:CM1	276	9.95%	193	3.78%
T:CD4+:CM2	38	1.37%	30	0.59%
T:CD8+:EM	272	9.81%	162	3.18%
T:CM	71	2.56%	75	1.47%
Treg	173	6.24%	200	3.92%
cDC2:CD1C+/CLEC10A+	54	1.95%	23	0.45%
vSMCs	53	1.91%	8	0.16%