

АНОПРІЄНКО О.В., ВАГІНА І.М., ЗАХАРУК О.А., МОРОЗОВА Л.М., СТРОКОВСЬКА Л.І.

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,

Україна, 03680, Київ, ул. ак. Заболотного, 150; e-mail: o.v.anoprienko@imbg.org.ua

ЕКСПРЕСІЯ ІНТЕРФЕРОН-ЧУТЛИВИХ ГЕНІВ ПРИ СУМІСНОМУ КУЛЬТИВУВАННІ КЛІТИН МЕЛАНОМИ І ФЕТАЛЬНИХ ФІБРОБЛАСТІВ МИШІ

На сучасному етапі стає все більш очевидно, що мікрооточення різних типів пухлин відіграє набагато критичнішу роль в ініціації пухлинного процесу, його прогресії і розвитку метастазів, ніж вважалося раніше [1]. Серед компонентів строми активовані фібробласти або пухлино-асоційовані фібробласти (ПАФ) привертають увагу як продуценти протуморогенних чинників. Одним з джерел ПАФ можуть бути мезенхімальні стовбурові клітини (МСК), що мають властивість тропізму до місць запалення і утворення пухлини. Ця властивість, а також відносна доступність і вивченість методів отримання МСК слугують приводом для досліджень можливості їх застосування як “векторних клітин”, що доставляють терапевтичний агент безпосередньо до пухлини або місць метастазування [2]. Особливо актуальною стратегія векторних клітин може бути для чинників, таких як β -інтерферон, що проявляють системну токсичність при внутрішньовенному введенні в організм у терапевтичних дозах. У ряді модельних експериментів з доставки IFN- β до пухлини за допомогою МСК був продемонстрований протипухлинний ефект [3]. Проте невивченими залишаються довготривалі і віддалені наслідки

такої потенційної терапії з огляду на здатність МСК надавати самостійну стимулюючу дію на ракові клітини. Ці факти роблять необхідним як ретельнішу характеристику системи «векторні клітини/протипухлинний агент/ракові клітини», так і пошук додаткових мішеней і засобів їх інактивації для більш ефективного пригнічення або знищення ракових клітин. Попередньо нами була показана інгібуюча дія IFN- β , що синтезується фетальними фібробластами, трансдукованими бакуловірусним вектором (Ac-CMV-IFN), на проліферацію пухлинних клітин меланоми миші (ММ4) при їх сумісному культивуванні. Для вивчення змін експресії інтерферон-чутливих генів в системі сумісно-культивованих фетальних фібробластів та клітин меланоми миші, яка моделює взаємодію стромальних фібробластів з клітинами пухлин *in vivo*, було проаналізовано 7 генів: *Mx1*, *p21*, *Dicer1*, *Ccl5*, *α -Sma(Acta2)*, *Epsti1*, *Gremlin1*. Загалом, ці гени є або інтерферон-індукованими генами, які грають певну роль у процесі онкогенезу, й/або генами, експресія яких відображає вплив стромальних клітин на трансформовані пухлинні клітини.

Матеріали і методи

Клітинні культури. В якості контрольних були обрані наступні монокультури клітин: культура клітин фетальних фібробластів миші C57Fb; фібробласти C57Fb, трансдуковані диким бакуловірусом AcMNPV через 24 години після трансдукції; C57Fb, трансдуковані рекомбінантним бакуловірусом Ac-CMV-IFN через 24 години після трансдукції; сублінія клітин меланоми миші (B16) ММ4; ММ4, оброблені кондиційним середовищем (с.м.). Для отримання кондиційного середовища фібробласти C57Fb трансдукували рекомбінантним бакуловірусом Ac-CMV-IFN. Після інкубації з вірусом клітини відмивали три рази розчином PBS і додавали свіже середовище. Після 24 годин культивування кондиційне середовище відбирали і викорис-

товували в співвідношенні 1:1 із свіжим DMEM+10%FBS для інкубації клітин ММ4 протягом 24 годин, після чого з клітин виділяли РНК.

Для дослідження можливих змін експресії обраних генів в системі сумісних культур фібробластів і клітин меланоми брали суміш клітин C57Fb:ММ4 у співвідношенні 1:10 і суміш фібробластів C57Fb, трансдукованих Ac-CMV-IFN, і ММ4 в тому ж співвідношенні. Динаміку змін експресії спостерігали при відборі культивованих клітин а) безпосередньо після змішування (0h); б) 24 години після сумісного культивування (24h) і в) на 5 добу сумісного культивування (120h). Для контролю зміни рівню експресії рекомбінантного інтерферону у ці ж часові точки

збирали фібробласти, трансдуковані Ас-CMV-IFN.

Виділення РНК та синтез кДНК. РНК виділяли за допомогою набору для виділення РНК на мініколонках фірми Fermentas (Літва, Thermo Fisher Scientific) згідно протоколу фірми-виробника. 2 мкг РНК обробляли ДНКазою (Fermentas) після чого по 1мкг РНК використовували в реакції зворотної транскрипції (RT+) для отримання кДНК з праймером oligo-dT та контрольної (RT-) реакції (без зворотної транскриптази) за допомогою набору для синтезу

Результати і обговорення

Злоякісна метастазуюча меланома є однією з найагресивніших пухлин людини. Застосування векторних клітин, як засобу доставки інтерферону може вносити додаткові фактори, які в свою чергу можуть модифікувати відповідь клітин меланоми на цей терапевтичний агент. Ми поставили завдання отримати початкову характеристику системи «потенційні векторні клітини C57Fb/IFN- β /клітини меланоми ММ4» за генами, експресія яких є інтерферон-залежною і свідчить про активацію певних сигнальних шляхів, а також, з огляду на великий метастатичний потенціал клітин меланоми, генами що відображають стромально-пухлинну взаємодію, і які можуть відігравати певну роль у підвищенні метастатичного потенціалу.

Ген *MxA/Mx1* (Muxovirus (Influenza virus) resistance A) є високоспецифічним біомаркером відповіді на інтерферони I типу. Його інгібуюча активність відносно рухливості й інвазивних властивостей ракових клітин була виявлена відносно недавно [4]. *MxA* розглядають як нову перспективну мішень для цілей попередження виникнення або терапії метастазів [4]. В наших експериментах експресія *MxA* на низькому рівні спостерігалась і в фібробластах, і в клітинах ММ4. Індукція інтерфероном відбувається в обох типах клітин. При сокультивуванні клітин спостерігається збільшення експресії *Mx1* візуально пропорційно рівню експресії *Ifn- β* і кількості інтерферон-продукуючих клітин в зразках (рис. 1).

В цілому, незважаючи на відсутність детекції експресії *Ifn- β* у відповідь на трансдукцію контрольним диким бакуловірусом (БК) клітин C57Fb ми спостерігаємо у них невелике підвищення експресії інтерферон-стимульованих генів (*Mx1*, *Epst11*, *Ccl5*) у порівнянні з контрольними фібробластами, що свідчить про певну активність самих БК-векторів по відношенню до клітин і здійсненню в них інтерферонової відпо-

кДНК (Fermentas). 2 мкл синтезованої кДНК використовували для ПЛР з праймерами на обрані гени. *Gapdh* було обрано у якості референтного гену домашнього господарства.

ПЛР. Полімеразну ланцюгову реакцію виконували за допомогою Таq-полімерази (Fermentas) у 20мкл реакційної суміші, що містила 10x буфер для полімерази, 300мкМ dNTP, по 10pmol прямого й зворотного праймерів, 1 од. Таq-полімерази і 2 мкл кДНК-матриці. Реакцію виконували на ампліфікаторі BIS Thermocycler (ООО "БИС-Н").

віді. Це може бути важливим при застосуванні векторних клітин на базі БК і вивченні імунної відповіді організму на терапію такими клітинними векторами.

Ген *p21WAF1* є інтерферон-чутливим, кодує інгібітор циклін-залежних кіназ СІР1 і є одним з основних ефекторних генів супрессору пухлин p53. В нашому експерименті ми спостерігаємо деяке підвищення рівню експресії гену *p21* в культурі клітин меланоми під впливом кондиційного середовища (рис. 1). Проте зміни експресії у сумісній культурі клітин неявні і вочевидь потребують дослідження за допомогою більш точних методів. Як було встановлено у інших роботах, IFN- β спричиняє більш виражену ніж IFN- α індукцію апоптозу у багатьох типах ракових клітин [5]. Але не всі клітини переходять у стадію апоптозу і, можливо, частина зупиняється у G0/G1 фазі клітинного циклу, що при зупиненні дії терапевтичного чинника дозволяє останнім продовжувати ріст.

DICER є ключовим фактором процесінгу мікроРНК (міРНК). Рівень експресії міРНК загалом знижений в пухлинах людини. Є дані про негативну регуляцію DICER інтерферонами I типу і при стресі [6]. Незалежно показано, що пригнічення експресії *DICER* є одним з шляхів, що призводять до розвитку менш диференційованого фенотипу трансформованих епітеліальних клітин, що є ознакою процесу Епітеліально-Мезенхімального переходу і сприяє метастазуванню [7]. В нашому аналізі експресії *Dicer* в культурах клітин миші спостерігається деяке зменшення рівню експресії мРНК гену при сумісному культивуванні клітин меланоми і фібробластів (рис. 1), що може бути ще одним з шляхів загального зниження активності DICER і підвищені метастазування клітин пухлини.

Експресія гену *α -Sma* (α -smooth muscle actin) є характерною ознакою міофібробластів – активованих фібробластів або ПАФ строми пух-

лин. На невеликому рівні він експресується також в мезенхімальних стовбурових клітинах, які ймовірно є основним джерелом ПАФ. Продукт гену грає певну роль в прогресуванні пухлини, проте механізм його дії невідомий. Аналіз експресії гену в клітинах C57Fb виявив його досить високий рівень в цих клітинах, відсутність індукції інтерфероном, проте відносно невелику індукцію в клітинах MM4 під впливом кондицій-

ного середовища (рис. 1). Але не спостерігається ніякої різниці у кількості продукту цього гену в сумісних культурах ні в динаміці, ні за різницею в пропорційній кількості клітин C57Fb і MM4, ні за експресією інтерферону. Ці дані вказують на додаткові фактори регуляції експресії цього гену і перспективність подальшого вивчення його ролі у розвитку пухлин різного походження.

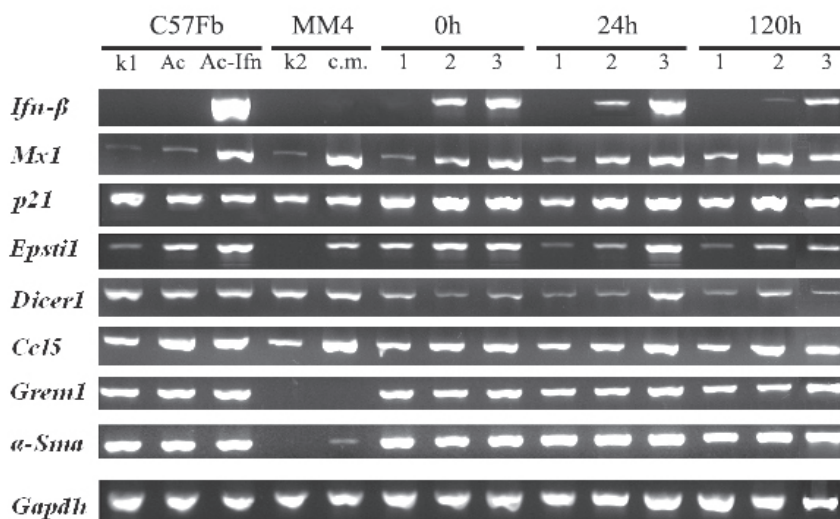


Рис. 1. Зміни експресії інтерферон-чутливих генів при сумісному культивуванні фетальних фібробластів C57Fb з клітинами меланоми миші MM4. Контрольні варіанти: k1 – фетальні фібробласти C57Fb; Ac – C57Fb, трансдуковані диким бакуловірусом AcMNPV; Ac-Ifn – C57Fb, трансдуковані Ac-CMV-IFN; k2 – клітини меланоми (MM4); c.m. – MM4, оброблені кондиційним середовищем; Варіанти сумісного культивування: 1. – контрольна суміш клітин C57Fb:MM4 (1:10); 2. –Ifn β -C57Fb:MM4 (1:10) – C57Fb, трансдуковані Ac-CMV-IFN:MM4; 3. – C57Fb, трансдуковані Ac-CMV-IFN (контроль)

GREMLIN-1 є секреторним антагоністом сигнального шляху BMP. Експресія GREMLIN 1 спостерігається виключно в стромі багатьох карциномних пухлини, але не в відповідних нормальних органах *in vivo* [8] Було зроблено висновок, що GREMLIN та інші антагоністи BMP роблять внесок в утворення сприятливого мікрооточення для росту багатьох типів раку. В нещодавній роботі було встановлено, що маркери *α-Sma* і *Gremlin-1* не перекриваються в популяції ПАФ шлункової дисплазії, що, за висновком авторів, свідчило про те, що *Gremlin-1* є маркером скоріше МСК в їх ніші в кістковому мозку, і також в мікрооточенні пухлини [9]. В нашому досліді експресія *Gremlin-1* спостерігається виключно в клітинах C57Fb. Індукція інтерфероном відсутня (рис. 1). Проте як і для *α-Sma* не спостерігається ніякої різниці у кількості продукту цього гену в сумісних культурах ні в

динаміці, ні за різницею в пропорційній кількості клітин C57Fb і MM4 (10% частина клітин C57Fb у зразках 0h№1 і 0h№2 і 100% фібробластів у контрольному зразку 0h№3). Ці дані, як і у випадку гену *α-Sma* потребують додаткового аналізу. Проте загалом, за попередніми даними експресії генів *α-Sma* і *Greml1* фетальні фібробласти C57Fb мають ознаки МСК-подібних клітин і їх застосування у якості модельних для вивчення взаємодії стромальні клітини/клітини пухлини може бути перспективним.

Хемокин CCL5(RANTES) грає певну роль в хемотаксисі та метастазуванні клітин раку молочної залози. Його експресія значно підвищувалась при сумісному культивуванні мезенхімальних стовбурових клітин з слабометастазуючими клітинами раку молочної залози, що збільшувало їх рухливість, інвазивність і метастазування [10]. У нашому експерименті спостері-

гається невелика індукція *Ccl5* в фібробластах при трансдукції як контрольним бакуловірусом, так і рекомбінантним Ас-СМV-IFN-β. Також помітне підвищення експресії *Ccl5* в клітинах ММ4 у відповідь на кондиційне середовище з інтерфероном у порівнянні з контрольними клітинами без обробки (рис. 1). Але значного підвищення рівню мРНК *Ccl5* у відповідь на сокультування двох типів клітин не виявлено. Це може бути результатом різного співвідношення фібробластів і пухлинних клітин (1:10 проти 1:2 у Karnoub et al., 2007) проте може також відображати різницю в характеристиках клітин, які використовували в експерименті в якості аналогів ПАФ (фетальні фібробласти і МСК).

Фактор EPSTI (Epithelial Stromal Interaction I) стимулює інвазивні властивості пухлинних клітин раку молочної залози, і є інтерферон-регульованим [11]. Ми підтвердили індукцію синтезу РНК *Epsti1* у відповідь на IFN-β як у фібробластах, так і в клітинах меланоми ММ4. При сумісному культивуванні C57Fb і ММ4 виявлено помітне зменшення рівню його РНК на 24 години і на 5 добу (120h) в порівнянні з 0 годиною. Проте сумісна культура ММ4 з фібробластами, що продукують інтерферон все ж виявляла дещо більший рівень експресії *Epsti1*, ніж сумісна культура з нетрансдукваними фібробластами (відповідно зразки 2 і 1 на 24 години і 120

годин). Таким чином потенційно цей фактор може робити вклад у віддалені наслідки як інтерферонової терапії, так і терапії векторними клітинами.

Таким чином, на невеликому наборі генів в системі «векторні клітини/IFN/клітини пухлини» ми спостерігаємо досить непросту картину змін експресії генів, активність яких направлена як в напрямку пригнічення рухливості і інвазивних властивостей пухлинних клітин, так і в протилежному напрямку. Ці зміни можуть бути опосередковані впливом як векторних фібробластів і власних активованих фібробластів пухлини (зменшення рівню експресії *Dicer* і *Epsti1*), так і дією інтерферону (підвищення експресії *Mx1*, *p21*, *Epsti1* і *Ccl5* і інгібування *Dicer* на посттрансляційному рівні), що робить необхідним подальше вивчення взаємодії всіх компонентів системи «клітинних векторів» з огляду на віддалені наслідки потенційної терапії з використанням цього методу. Інгібуюча дія інтерферону охоплює вочевидь не всі можливі шляхи, що сприяють росту і метастазуванню пухлин. Проведений аналіз дозволяє зробити висновки про перспективність пошуку підсилюючих терапевтичний вплив інтерферону чинників, можливо направлених у бік стромальних компонентів пухлин.

Література

1. Ostman A., Augsten M. Cancer-associated fibroblasts and tumor growth-bystanders turning into key players // *Curr. Opin. Genet. Dev.* – 2009. – Vol. 19. – P. 67-73.
2. Hall B., Dembinski J., Sasser A.K., et al. Mesenchymal stem cells in cancer: tumor-associated fibroblasts and cell-based delivery vehicles // *Int. J. Hematol.* – 2007. – Vol. 86, № 1. – P. 8-16.
3. Kidd S., Caldwell L., Dietrich M., et al. Mesenchymal stromal cells alone or expressing interferon-beta suppress pancreatic tumors in vivo, an effect countered by anti-inflammatory treatment // *Cytotherapy.* – 2010. – Vol. 12. – P. 615-625.
4. Mushinski J.F., Nguyen P., Stevens L.M., et al. Inhibition of tumor cell motility by the interferon-inducible GTPase MxA // *J. Biol. Chem.* – 2009. – Vol. 284. – P. 15206-15214.
5. Chawla-Sarkar M., Leaman D.W., Borden E.C. Preferential induction of apoptosis by Interferon (IFN)-β compared with IFN-α: correlation with TRIL/Apo2L induction in melanoma cell lines // *Clinical Cancer Research.* – 2001. – Vol. 7. – P. 1821-1831.
6. Wiesen J.L., Tomasi T.B. Dicer is regulated by cellular stresses and interferons // *Mol. Immunol.* – 2009. – Vol. 46, №6. – P. 1222-1228.
7. Martello G., Rosato A., Ferrari F., et al. MicroRNA targeting dicer for metastasis control // *Cell.* – 2010. – Vol. 141, №7. – P. 1195-1207.
8. Sneddon J.B., Zhen H.H., Montgomery K., et al. Bone morphogenetic protein antagonist gremlin 1 is widely expressed by cancer-associated stromal cells and can promote tumor cell proliferation // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2006. – Vol. 103, №40. – P. 14842-14847.
9. Quante M., Tu S.P., Tomita H., et al. Bone marrow-derived myofibroblasts contribute to the mesenchymal stem cell niche and promote tumor growth // *Cancer Cell.* – 2011. – Vol. 19. – P. 257-272.
10. Karnoub A.E., Dash A.B., Vo A.P., et al. Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis // *Nature.* – 2007. – Vol. 449, №7162 – P. 557-563.
11. de Neergaard M., Kim J., Villadsen R. et al. Epithelial-stromal interaction 1 (EPSTI1) substitutes for peritumoral fibroblasts in the tumor microenvironment // *The American J. of Pathol.* – Vol. 176, №3. – P. 1229-1240.

ANOPRIYENKO O.V., VAGINA I.N., ZAKHARUK O.A., MOROZOVA L.M., STROKOVSKA L.I.
Institute of molecular biology and genetics NAS of Ukraine
Ukraine, 03680, Kyiv, ak. Zabolotnogo str., 150; e-mail: o.v.anoprienko@imbg.org.ua

EXPRESSION OF INTERFERON-SENSITIVE GENES IN COCULTURE OF MOUSE MELANOMA AND FETAL FIBROBLAST CELLS

Aims. On the model of triple system «potential vector cells C57Fb/ IFN- β / melanoma MM4 cells» we aimed to trace changes in expression of interferon-sensitive genes, and genes which expression may depend on stromal part of tumors and might play roles in enhancing of metastatic potential of tumorous cells. **Methods.** Mono cell cultures and cocultures of C57Fb fibroblasts and MM4 melanoma cells were used to investigate gene expression changes by PR-PCR. **Results.** On the set of 7 genes in the system «potential vector cells C57Fb/IFN- β /melanoma MM4 cells» we observe pattern of complicated changes in expression of genes, which activity is assigned towards the inhibition of motile and invasive properties of tumorous cells, and in the opposite direction. These changes may be mediated as by the vector fibroblasts or own tumor activated fibroblasts and by the action of interferon. **Conclusions.** We speculate the promise of finding factors enhancing the therapeutic effect of interferon directed toward stromal components of tumors.
Key words: cancer therapy, cancer-associated fibroblasts; melanoma, interferon, baculovirus.

БІЛИНЬСЬКА О.В.

Інститут рослинництва ім. В. Я. Юр'єва Національної академії аграрних наук України
61060, Харків, проспект Московський, 142, e-mail: bilinska@ukr.net

ВПЛИВ УМОВ ВИРОЩУВАННЯ ДОНОРНИХ РОСЛИН ТА СКЛАДУ ЖИВИЛЬНОГО СЕРЕДОВИЩА НА ЕФЕКТИВНІСТЬ ОТРИМАННЯ ГАПЛОЇДІВ РІПАКУ ЯРОГО В КУЛЬТУРІ ПИЛЯКІВ *IN VITRO*

Для ріпаку, як і для інших видів, встановлено чітку залежність індукції андрогенних структур та перебігу регенерації від умов вирощування рослин-донорів пиляків [1–3]. Зокрема, доведено, що оптимальним режимом для отримання високоякісного щодо індукції морфогенезу в культурі *in vitro* пиляків та ізольованих мікроспор матеріалу ріпаку є субоптимальна температура: 10 °С день/5 °С ніч [1, 4]. Однак такий температурний режим може бути підтриманий лише за наявності спеціальних камер штучного клімату з технічними можливостями для забезпечення істотного зниження температури при високому рівні освітленості, що неминуче призводить до значних витрат електроенергії. Менш енерговитратними є теплиці з комбінованим освітленням, але вони не забезпечують стабільного температурного режиму [5].

Слід зазначити, що з огляду на високу вартість вирощування рослин у камерах штучного клімату, польові умови при різних строках сівби нерідко залишаються єдиним засобом отримання вихідного матеріалу для біотехнологічних досліджень. Більш того, як показали наші експерименти, проведені на ячмені ярого, пожнивна сівба (липень–серпень) за штучного поливу дозволяє вирощувати матеріал, який не лише не

поступається рослинам оптимального весняного строку сівби за здатністю до андрогенезу *in vitro*, але й перевищує їх [6]. Практика поживної сівби, за рахунок якої проведення робіт переноситься на менш спекотні вересень і жовтень, на нашу думку, є особливо актуальною на тлі глобальних змін клімату.

Не менш важливим чинником для реалізації морфогенетичного потенціалу в культурі *in vitro* будь-яких експлантатів, включаючи пиляки [7–9], є склад живильного середовища. Для культивування пиляків ріпаку застосовуються середовища на основі композиції солей макро- та мікроелементів B5 [10] та MS [11]. Ізольовані мікроспори культивують також на середовищі NLN-13 [12], яке відрізняється зменшеним вдвічі вмістом нітратного азоту.

Характерною особливістю цих середовищ є високий вміст сахарози та низький вміст стимуляторів росту ауксинової дії. Разом з тим відомо, що за стресових умов, які можуть мати місце в період вирощування матеріалу для експериментів у галузі андрогенезу *in vitro*, підвищення концентрації ауксинів чи застосування у живильному середовищі їх більш активних за фізіологічним ефектом аналогів дозволяє отримати стабільніші результати [13].