

**С.В. Цибульников, Д.Р. Файзуллина, Д.А. Анискин, И.С. Карлина,
М.Ю. Степень**

**СРАВНЕНИЕ ПОВЕРХНОСТНЫХ И ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ БЕЛКОВ,
СПОСОБСТВУЮЩИХ ИНТЕРНАЛИЗАЦИИ ОНКОЛИТИЧЕСКОГО ВИРУСА
И ЭКСПРЕССИИ ЦЕЛЕВЫХ ГЕНОВ, В 2D И 3D КЛЕТОЧНЫХ МОДЕЛЯХ
САРКОМЫ ЮИНГА.**

Научный руководитель: д-р биол. наук И.В. Уласов

Институт регенеративной медицины

*Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова
Минздрава России, г. Москва*

**S.V. Tsibulnikov, D.R. Fayzullina, D.A. Aniskin, I.S. Karlina, M.Y. Stempen
COMPARISON OF SURFACE AND INTRACELLULAR PROTEINS THAT
PROMOTE ONCOLYTIC VIRUS INTERNALIZATION AND TARGET GENE
EXPRESSION IN 2D AND 3D CELL MODELS OF EWING'S SARCOMA.**

Tutor: Dr. Sci. Biol. I.V. Ulasov

Institute for regenerative medicine

Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow

Резюме. Создание адекватных и релевантных моделей саркомы Юинга *in vitro* является важной задачей для поиска новых эффективных путей терапии. В данном исследовании мы сравнили 2D и 3D модели на основе монослойной культуры клеток и клеточных сфероидов, соответственно, на предмет наличия целевых белков, важных для терапии с использованием онколитического вируса.

Ключевые слова: саркома, вирус, аденовирус, сфероид.

Resume. Development of adequate and relevant models of Ewing's sarcoma *in vitro* is a crucial goal for the search for new effective ways of therapy. In this study, we compared 2D and 3D models based on monolayer cell culture and cell spheroids, respectively, on the presence of target proteins important for oncolytic virus therapy.

Keywords: sarcoma, virus, adenovirus, spheroid.

Актуальность. Саркома Юинга (Ewing Sarcoma, ES) - агрессивная злокачественная опухоль, наиболее часто поражающая детей и подростков, характеризующаяся быстрым ростом опухоли и активным метастазированием [Lin, Wang, Lozano, 2011]. Пик заболеваемости приходится на второе десятилетие жизни, и, согласно статистике, мужчины страдают ES примерно в полтора раза чаще, чем женщины. ES чаще всего обнаруживается в костях, особенно в тазу, бедренной кости или осевом скелете, но также обнаруживается в мягких тканях у 30% [Applebaum et al., 2012] пациентов и составляет примерно 15% всех костных сарком [Ordóñez et al., 2009].

Рецидивирующий и рефрактерный характер ES и низкая терапевтическая эффективность требуют разработки новых подходов к лечению. Хотя необходимость разработки новых лекарств, активных молекул и методов комбинированной терапии очевидна, не менее важным элементом лечения, который иногда остается незамеченным, является эффективная доставка препарата к клеткам-мишеням.

Цель: Анализ белков, способствующих интернализации онколитического вируса и экспрессии целевых генов, на *in vitro* моделях саркомы Юинга.

Задачи:

1. Создание 2D (монослойные культуры) и 3D (клеточные сфероиды) моделей саркомы Юинга на основе первичных культур клеток, полученных от пациентов.
2. Характеристика поверхностных маркеров и целевых белков в разработанных 2D и 3D моделях саркомы Юинга.

Материалы и методы. В работе использовали первичные культуры клеток саркомы Юинга (Ewing Sarcoma sample 36, ES36), полученные от пациентов с соответствующим диагнозом после получения добровольного информированного согласия. В условиях лаборатории биопсийный материал отмывали в физиологическом растворе (Биолот, Россия) с добавлением антибиотиков (пенициллин-стрептомицин, гентамицин, Sigma Aldrich, Германия). Полученную после стандартной ферментативной обработки суспензию клеток помещали в культуральные флаконы для дальнейшей экспансии. Клетки культивировали на адгезивных культуральных флаконах в стандартных условиях (37°C, 5%CO₂) в питательной среде следующего состава: DMEM/F12 (1:1, БиолоТ, Россия), гентамицин (50 мкг/мл, ПанЭко, Россия), эмбриональная телячья сыворотка FBS (10%, Thermo Fisher, США). Смену сред осуществляли каждые 2-3 дня.

Монослойные культуры клеток ES36, культивируемые на поверхности адгезивной пластиковой посуды, и достигшие конfluenceности 80%, рассматривали в качестве 2D модели саркомы Юинга. Для получения 3D модели саркомы Юинга *in vitro* использовали клеточные сфероиды.

Сфероиды получали культивированием в 3D условиях на неадгезивных агарозных планшетах. Агарозу растворяли при нагревании в смеси сред DMEM/F12 1:1 с добавлением гентамицина (50 мкг/мл) в концентрации 0.02 г/мл и наносили на силиконовые молды-реплики (MicroTissues 3D Petri Dish, Merck, США). После застывания агарозы планшеты вынимали из молдов и обрабатывали УФ светом по 5 минут с каждой стороны. Для получения сфероидов в каждый планшет вносили 150 мкл суспензии клеток с концентрацией 1000 тыс. кл/мл). Сфероиды формировались в лунках планшетов, один сфероид на лунку, и через 7 суток культивирования в 3D условиях сфероиды использовали для дальнейших манипуляций.

Клетки анализировали на наличие специфичных поверхностных маркеров и целевых белков (десмоглеин, CXCR4, CAR, KISS1R, ITGA3b5, survivin) на проточном цитофлуориметре Sony SH800S (Sony Biotechnology, USA). Суспензии живых клеток в количестве не менее 1 млн клеток на образец окрашивали антителами против целевых белков (все – конъюгированные с флуорохромом PE (phycoerythrin), Myltenyi Biotec, Германия) в соотношении 1:100 (1 мкл антител на 100 мкл клеточной суспензии) в течение 15 минут в темноте. В качестве изотипического контроля использовали антитела против иммуноглобулинов мыши (IgG1-PE, Myltenyi Biotec, Германия), также для установления уровня автофлуоресценции и фоновой флуоресценции часть суспензии клеток оставляли неокрашенной. Измерения проводили с использованием лазера с длиной волны 488 нм.

Для иммуноцитохимического окрашивания образцы фиксировали в 4% растворе параформальдегида (pH 6,9, Sigma-Aldrich, Германия) в течении ночи при температуре 4°C, затем трижды отмывали от фиксатора в PBS (pH 7,4). После этапов пермеабиллизации (10 мин, 0.2% раствор Triton X-100, PanReac AppliChem, США) и блокирования (10 мин, 5% FBS, HyClone, США) конструкторы инкубировали в течение ночи при 4°C с первичными антителами против целевых белков (1:1000 и 1:250, соответственно, Abcam, Великобритания). Растворы первичных антител содержали 0,1% Triton X-100 для улучшения проницаемости мембраны. Затем образцы трижды промывали PBS (pH 7,4) и инкубировали со вторичными антителами, конъюгированными с Alexa Fluor 488 и Alexa Fluor 594 (1:1000, Thermo Scientific, США) при комнатной температуре в темноте в течение 1 ч. Ядра клеток контрастировали бисбензимином (Hoechst 33258, Thermo Scientific, США). Окрашенные образцы анализировали с применением лазерного сканирующего конфокального микроскопа LSM 880 (Zeiss, Германия) с использованием для возбуждения лазеров с длинами волн 405, 488 и 594 нм либо флуоресцентного микроскопа EVOS (ThermoFisher, США).

Результаты и их обсуждение. При анализе методом проточной цитофлуориметрии были получены данные о поверхностных маркерах и некоторых целевых белках в клетках первичной культуры ES36 и линии U87(Позитивный контроль антител) в двумерной модели (Рис.1). Анализ показал отсутствие исследуемых белков в большинстве исследуемых клеток саркомы. KISS1R положительные клетки составляли 10,24% общей популяции.

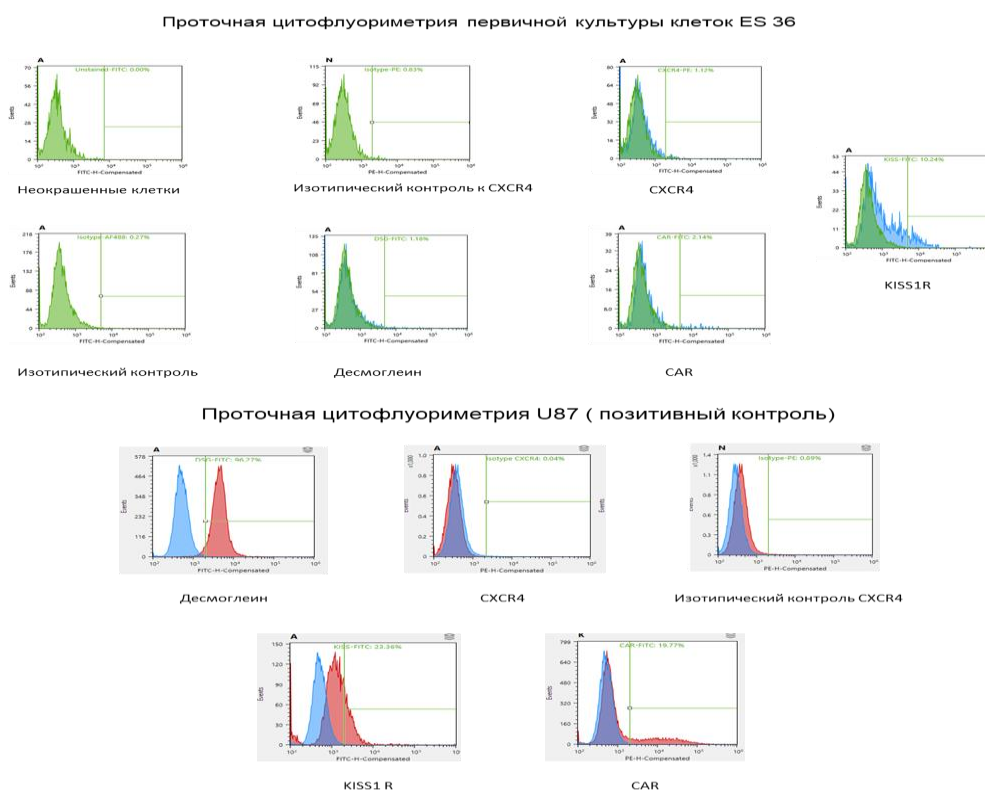


Рис. 1 – Проточная цитофлуориметрия клеток первичной культуры клеток саркомы Юинга и клеточной линии U87 в 2D

С помощью метода иммуноцитохимического окрашивания было показано наличие белков ITGA3b5 и Survivin в клетках ES36 в двумерной модели (Рис. 2).

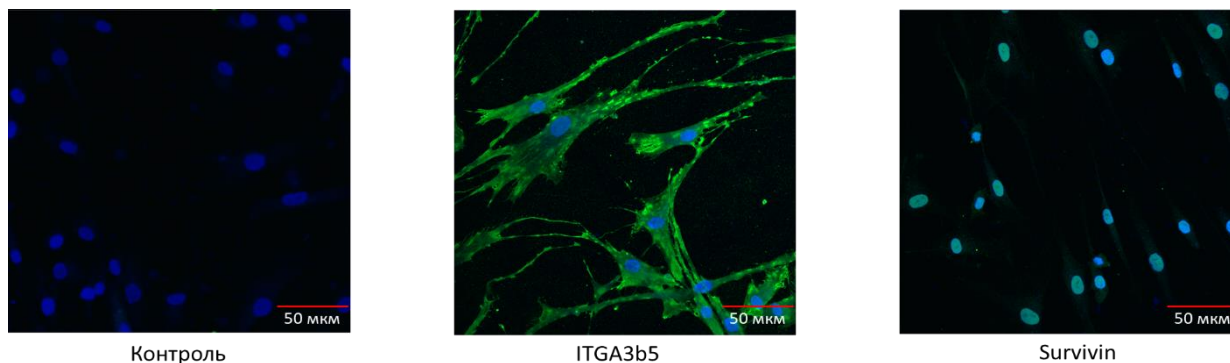


Рис. 1 – Иммуноцитохимическое окрашивание клеток ES36 в 2D. Зеленый – целевой белок, синий – ядра клеток.

Далее мы анализировали тот же список интересующих белков в клетках ES36 и A673 в трехмерных моделях методом иммуноцитохимического окрашивания (Рис. 3).



Рис. 3 – Иммуноцитохимическое окрашивание клеточных сфероидов из культуры ES36 и линии A673. Зеленый – целевой белок

Выводы:

1. Показано, что в случае использования трехмерной модели экспрессия целевых поверхностных антигенов возрастает, относительно показателей двумерной модели.

2. На двумерной модели показано наличие субъединицы интегрин альфа-3, необходимого для проникновения вируса в клетку, а также наличие в клетке белка survivin, который является промотором используемого онколитического вируса.

Литература

1. Applebaum M. A. et al. Clinical Features and Outcomes in Patients with Ewing Sarcoma and Regional Lymph Node Involvement // *Pediatr. Blood Cancer*. 2012. V. 59. № 4. P. 617.
2. Lin P. P., Wang Y., Lozano G. Mesenchymal stem cells and the origin of Ewing's sarcoma // *Sarcoma*. 2011. V. 2011.
3. Ordóñez J. L. et al. Advances in Ewing's sarcoma research: Where are we now and what lies ahead? // *Cancer Res*. 2009. V. 69. № 18. P. 7140–7150.