

УДК 577.2

Получение мышинной клеточной линии FDC-P1 со сверхэкспрессией гена *KIT* N822K человека

Э. Р. Вагапова*, Т. Д. Лебедев, В. И. Попенко, О. Г. Леонова, П. В. Спирин, В. С. Прасолов

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, 119991 Россия

*E-mail: vr.elmira@gmail.com

Поступила в редакцию 26.07.2019

Принята к печати 09.12.2019

DOI: 10.32607/actanaturae.10938

РЕФЕРАТ Для изучения процессов злокачественного перерождения кроветворных клеток и механизмов развития резистентности лейкозных клеток к химиотерапевтическим препаратам необходимы новые модельные системы. На основе цитокинзависимой мышинной клеточной линии FDC-P1 острого миелоидного лейкоза (ОМЛ) нами получены перевиваемые клетки с эффективной эктопической экспрессией мутантного гена *KIT* N822K человека. Изучена роль повышенной экспрессии мутантного *KIT* в выживаемости и чувствительности этих клеток к терапевтическим препаратам. Также создана и охарактеризована смешанная культура, состоящая из линии FDC-P1 лейкозных клеток мыши и линии HS-5 стромальных клеток человека. Полученные результаты могут быть использованы для изучения роли мутаций N822K в гене *KIT* в ответе клеток на противолейкозные препараты, факторы роста и цитокины. Эти данные представляют интерес для разработки эффективных подходов к терапии лейкозов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА острый миелоидный лейкоз (ОМЛ), рецепторная тирозинкиназа *KIT*, FDC-P1, *KIT* N822K, стромальные клетки.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ SCF – фактор стволовых клеток (stem cell factor); ОМЛ – острый миелоидный лейкоз; FAB M2 – острый миелобластный лейкоз с созреванием (подтип ОМЛ по Франко-Американо-Британской классификации); CD34 – дифференцировочный кластер 34.

ВВЕДЕНИЕ

Экспрессия гена *KIT*, кодирующего рецепторную тирозинкиназу, характерна для различных злокачественных заболеваний: лейкозов, нейробластом, гастроинтестинальных стромальных опухолей (ГИСО), мастоцитом и меланом [1–3]. В ходе нормального гемопоэза *KIT* экспрессируется в субпопуляции незрелых гемопоэтических клеток-предшественников, позитивных по CD34 (маркер стволовых клеток и ранних клеток-предшественников) [4].

В клетках острого миелоидного лейкоза (ОМЛ) и мастоцитоза встречаются мутации в гене киназы *KIT*, причем наиболее часто это мутации D816V и N822K, локализованные в тирозинкиназном домене и приводящие к ее конститутивной активации. Активирующие мутации D816V и D814V вызывают существенное уменьшение чувствительности клеток, несущих эти мутации, к ингибитору *KIT* – иматинибу (Gleevec; Novartis Pharma AG, Basel, Швейцария) *in vitro* и *in vivo* [5, 6]. Мутации в киназном домене *KIT* ассоциированы с повышенной частотой рецидивов

FAB M2 ОМЛ после химиотерапии [7]. Иматиниб – высокоселективный ингибитор киназ Abl, BCR-ABL, PDGFR α/β и *KIT*, применяется при BCR-ABL-позитивных лейкозах и ГИСО с мутациями в генах *KIT* и *PDGFR*. В комбинации с другими антилейкозными препаратами иматиниб используют при ОМЛ. Показано, что иматиниб эффективно воздействует на клетки ОМЛ у пациентов высоких групп риска. Однако монотерапия иматинибом в высокой концентрации нередко приводит к развитию тяжелой цитопении и поэтому не рекомендуется [8].

На основе цитокинзависимой клеточной линии FDC-P1 лейкоза мышей с невысоким уровнем экспрессии гена *KIT* дикого типа мы получили новую перевиваемую линию клеток со сверхэкспрессией мутантного гена *KIT* N822K человека и изучили роль этой мутации, локализованной в тирозинкиназном домене, в поддержании злокачественного статуса лейкозных клеток – выживаемости, чувствительности к препаратам и росте в контакте со стромальными клетками.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Культуры клеток

Перевиваемые клетки FDC-P1 культивировали в среде IMDM, содержащей 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (FBS), 100 ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 1 мМ пирувата натрия, 2 мМ L-глутамина и 7% кондиционированной среды клеток WEHI-3В, содержащей интерлейкин-3 (IL3) мыши, при 37°C и 5% CO₂. Линию стромальных клеток HS-5 человека культивировали в среде RPMI-1640 с добавлением 10% FBS, 100 ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 1 мМ пирувата натрия, 2 мМ L-глутамина. Все реагенты производства Gibco, ThermoFisher Scientific (США). Линии клеток получены из Heinrich-Pette Institute-Leibniz Institute for Experimental Virology (HPI, Гамбург, Германия) и протестированы на отсутствие контаминации микоплазмой.

Иммуноцитохимический анализ клеток

Для проведения качественного анализа клетки FDC-P1 фиксировали 4% параформальдегидом на 0.1 М фосфатном буфере (ФСБ) в течение 15 мин, далее промывали ФСБ, обрабатывали ФСБ с 0.2% Triton X-100 и антителами, специфичными к белку KIT человека, конъюгированными с красителем PerCP/Cy5.5 (PerCP/Cy5.5, Abcam, ab157320, 1 : 50). После промывки ФСБ клетки заключали в заливочную среду Slowfade gold (Invitrogen, США, s36936), содержащую 1 мкг/мл DAPI (Sigma-Aldrich, США), препараты герметизировали лаком для ногтей. Препараты анализировали с использованием конфокального микроскопа Leica TCS SP5 (Leica, Германия) и объектива HCX PLAPO CS. Для количественного определения интенсивности окраски клетки FDC-P1 обрабатывали антителами, специфичными к белку KIT человека, конъюгированными с красителем PerCP/Cy5.5 (PerCP/Cy5.5, Abcam, ab157320, 1 : 50) и анализировали на проточном цитофлуориметре LSRFortessa (BD Biosciences). Результаты анализировали при помощи программного обеспечения FlowJo.

Количественная ПЦР в реальном времени и дизайн праймеров

РНК выделяли с использованием Trizol (Invitrogen, США) в соответствии с протоколом производителя. Концентрацию препарата РНК и его чистоту определяли на спектрофотометре (NanoDrop). кДНК синтезировали с помощью набора для обратной транскрипции ThermoFisher (Random-праймеры). ПЦР в реальном времени проводили с флуоресцентным красителем Maxima SYBR Green Supermix (Thermo

Scientific) на амплификаторе CFX96 Real-Time System (Bio-Rad, США). Экспрессию целевых генов нормировали на экспрессию гена β-актина (*b-actin*) в каждой пробе. Подсчет Ct и относительного уровня экспрессии производили в программном обеспечении CFX Manager 3.1. В каждом эксперименте использовали не менее трех повторов. Праймеры подбирали с помощью Primer Blast (NCBI, США) по следующим параметрам: размер продукта амплификации 50–200 п.н., температура отжига праймеров 57°C. Энергетические характеристики пар праймеров проверяли с использованием Oligo Analyzer (idtdna) для исключения образования высокоэнергетических шпилечных конструкций и димеров (более 10 кДж). Последовательности праймеров: B-actin forward 5'-TCAAGATCATTTGCTCCTCCTGA-3'; B-actin reverse 5'-ACGCAGCTCAGTAACAGTCC-3'; musKIT forward 5'-CCATAGACTCCAGCGTCTTCC-3'; musKIT reverse 5'-GCCTGGATTTGCTCTTTGTTGTT-3'; humKIT forward 5'-CCACCCTGGTCAT-TACAGAA-3'; humKIT reverse 5'-CTCCAGGTT-TCATGTCCATG-3'.

Статистический анализ

Все тесты и подсчеты отклонений анализировали с использованием программного обеспечения GraphPad prism.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Получение перевиваемых клеток мышинного лейкоза со сверхэкспрессией мутантного гена *KIT N822K* человека

С целью анализа онкогенного потенциала рецепторной тирозинкиназы KIT с мутацией N822K в киназном домене, в частности, ее способности влиять на пролиферацию лейкозных клеток миелоидного происхождения, получена клеточная линия FDC-P1 N822K. Для этого IL3-зависимые клетки FDC-P1 мыши трансдуцировали ретровирусным вектором, направляющим экспрессию гена, кодирующего рецепторную тирозинкиназу KIT человека с мутацией N822K. Этот вектор также направляет синтез маркерного зеленого флуоресцентного белка GFP (*рис. 1А*). Вектор любезно предоставлен Carol Stocking (HPI, Гамбург, Германия). Контрольную линию клеток трансдуцировали исходным ретровирусным вектором, не содержащим *KIT N822K*.

Популяция клеток с наибольшей интенсивностью флуоресценции в канале FITC, что соответствует высокой экспрессии GFP, была отобрана на клеточном сортере (S3e Cell Sorter, Bio-Rad) (*рис. 1Б*). В отобранных клетках методом количественной ПЦР в реальном времени определена экспрессия гена *KIT*

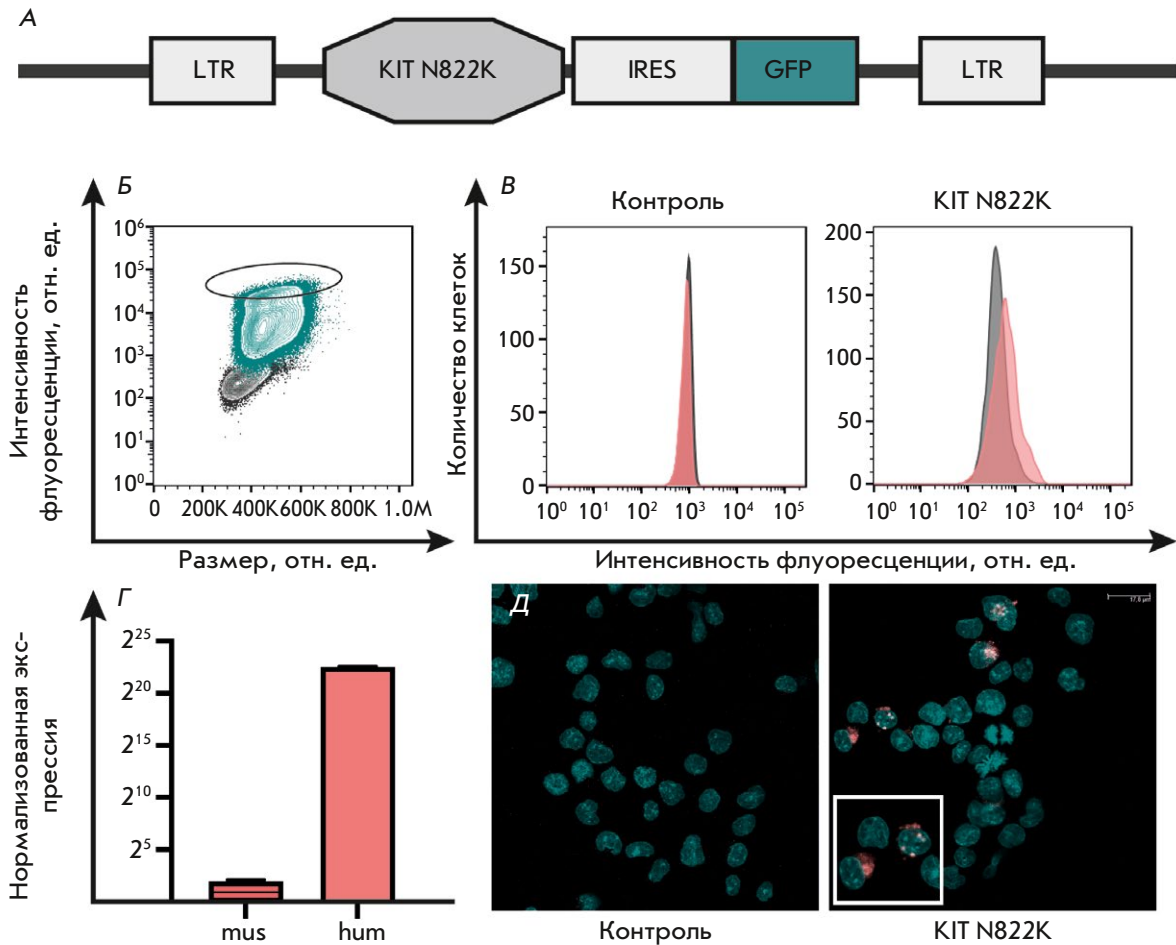


Рис. 1. Сверхэкспрессия гена *KIT* человека в клетках мышиного лейкоза FDC-P1. А – схема вектора, направляющего экспрессию гена *KIT N822K* человека. Б – сортировка популяции клеток с высокой интенсивностью флуоресценции в канале FITC (FL1) (выделено контуром), серым показаны нетрансдуцированные клетки FDC-P1, зеленым – трансдуцированные вектором *KIT N822K*. Экспонирование рецептора KIT на поверхности контрольных клеток и клеток со сверхэкспрессией мутантного гена *KIT N822K* человека. В – клетки обработаны моноклональными антителами к KIT человека, конъюгированными с PerCP/Cy5.5 и проанализированы на проточном цитофлуориметре. Интенсивность не обработанных антителами клеток показана серым цветом, обработанных антителами к KIT – розовым. Г – уровень экспрессии мРНК гена *KIT* мыши (*mus*) и *KIT* человека (*hum*) в клетках FDC-P1 со сверхэкспрессией *KIT N822K* по данным ПЦР. Д – микрофотография клеток FDC-P1, инкубированных с антителами к рецептору KIT человека (розовый цвет) и красителем ДНК DAPI (зеленый)

(рис. 1Г). Клетки FDC-P1 N822K экспонируют белок KIT (рис. 1В). Присутствие белка KIT человека в клетках FDC-P1 KIT N822K подтверждено с помощью конфокальной микроскопии, тогда как в клетках FDC-P1, трансдуцированных контрольным вектором, экспрессия KIT человека не обнаружена – ни на уровне мРНК, ни на уровне белка (рис. 1В,Д).

Введение *KIT N822K* приводит к IL3-независимому росту клеток FDC-P1

Контрольные клетки и клетки FDC-P1 N822K были посеяны с одинаковой плотностью. Подсчет клеток

проводили в течение 6 дней. Введение мутантного *KIT N822K* не влияло на скорость роста клеток FDC-P1 в присутствии IL3 (рис. 2А).

Сверхэкспрессия мутантного гена *KIT* в клетках FDC-P1 приводит к их фактор-независимому росту (рис. 2А). Скорость роста контрольных клеток FDC-P1 существенно снижается в среде с пониженным содержанием кондиционированной среды с IL3 (0.25%).

Мы не зарегистрировали существенного изменения скорости роста клеток под действием лиганда KIT – SCF (Abcam) (рис. 2Б). Контрольные и FDC-P1

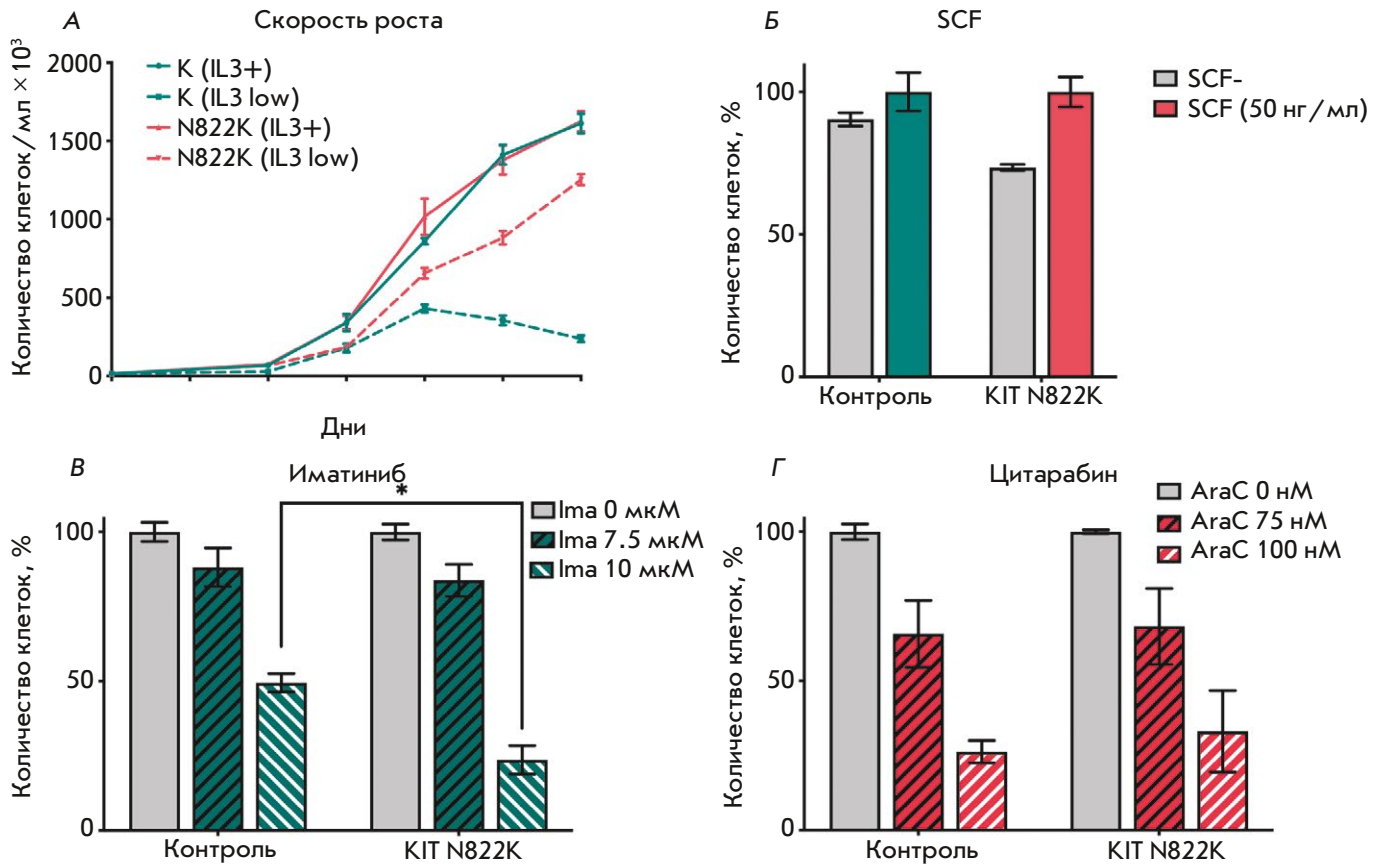


Рис. 2. Скорость роста клеток FDC-P1 в присутствии IL3 (сплошная линия) и при пониженном содержании IL3 (пунктирная) (А). Количество клеток FDC-P1, обработанных рекомбинантным SCF, в 1 мл среды (Б). Количество клеток FDC-P1 (в %) относительно необработанных клеток на 3 день после добавления иматиниба (В) и цитарабина (Г). * – $p < 0.05$

N822K-клетки были обработаны противоопухолевыми препаратами: иматинибом (7.5 и 10 мкМ) и цитарабином (75 и 100 нМ). Количество клеток подсчитывали на 3 день после добавления препаратов. Концентрация иматиниба, ингибирующая рост контрольных клеток FDC-P1 на 50% (IC_{50}), составила 10 мкМ. Клетки FDC-P1 со сверхэкспрессией *KIT* N822K были более чувствительными к этой концентрации препарата (рис. 2В). Чувствительность клеток к цитарабину осталась такой же, как в контроле (рис. 2Г).

Полученные нами данные соответствуют результатам, согласно которым мутация в тирозинкиназном домене *KIT*, в частности D816V, усиливает чувствительность к иматинибу [9].

Получение смешанной культуры лейкозных и стромальных клеток

Факторы, которые продуцируют стромальные клетки, участвуют в стимуляции пролиферации кровяных клеток, регуляции клеточного цикла, а также

контролируют апоптоз. В то же время процессы, происходящие при контакте стромальных клеток с лейкозными, плохо изучены.

Перевиваемые стромальные клетки человека HS-5 были посеяны в количестве 5000 клеток на лунку. На следующий день культуральную среду клеток HS-5 сменили на среду IMDM, содержащую клетки FDC-P1 (500 клеток на лунку). Через 3 и 5 дней после посева подсчитали количество клеток в суспензионной фракции. Прямой контакт лейкозных и стромальных клеток приводит к снижению скорости роста контрольных клеток FDC-P1 (рис. 3А, Б), но не клеток FDC-P1, сверхэкспрессирующих *KIT* N822K.

Известно, что цитокины и факторы роста, продуцируемые клетками стромы (в том числе HS-5), могут модулировать экспрессию гена *KIT* в кокультурируемых с ними лейкозных клетках [10]. Вероятно, скорость роста клеток FDC-P1 с эктопической экспрессией *KIT* N822K не меняется при сверхэкспрессии данной киназы. Кроме того, скорость роста может

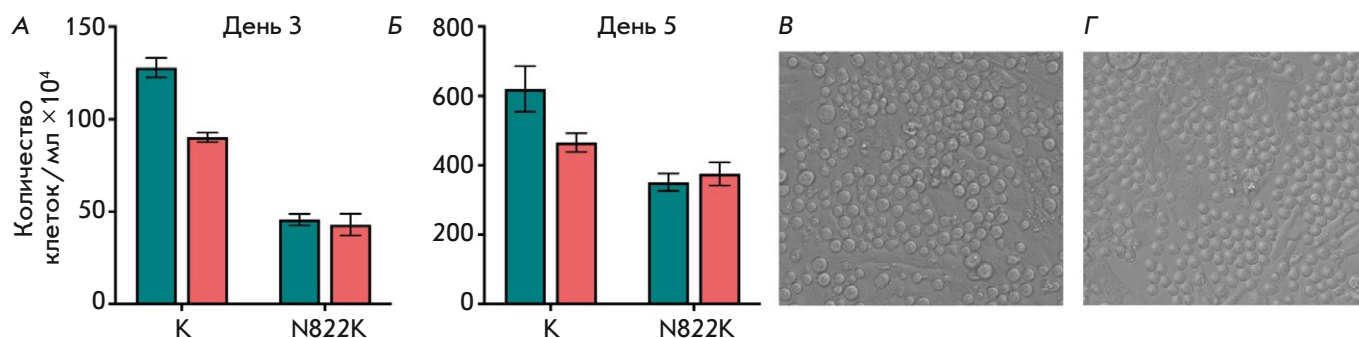


Рис. 3. Количество клеток FDC-P1, культивируемых в отсутствие (зеленый цвет) и в присутствии стромальных клеток HS-5 (розовый цвет) на 3-й (А) и 5-й (Б) день; фотографии культуры клеток FDC-P1, смешанных с HS-5: контрольные (В), N822K (Г). Продольные клетки стромы адгезируют ко дну планшета, круглые клетки FDC-P1 находятся в суспензии

отличаться из-за различий в адгезии контрольных клеток FDC-P1 и клеток FDC-P1 N822K.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

IL3-зависимая мышьячная клеточная линия FDC-P1 широко используется для исследования онкогенного действия киназ, транскрипционных факторов, а также эффективности противолейкозных препаратов [11, 12]. Нами получена и охарактеризована линия клеток FDC-P1 со сверхэкспрессией мутантного гена *KIT* N822K человека. Показано, что мутация N822K в гене *KIT* приводит к увеличению чувствительности клеток FDC-P1 к иматинибу. Мутация D419A во внеклеточном домене рецептора *KIT* также повышает чувствительность клеток к иматинибу [9]. Показано снижение скорости роста контрольных клеток при контакте со стромой, что не характерно

для клеток FDC-P1, экспрессирующих мутантный ген *KIT* N822K. Исследование механизмов взаимодействия лейкозных клеток со стромальными требует более пристального внимания для установления возможного вклада стромальных клеток в ответ лейкозных клеток на химиотерапевтические агенты. Полученная нами модель может использоваться для тестирования различных противолейкозных препаратов, в том числе при совместном культивировании лейкозных и стромальных клеток. ●

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ: эксперименты по получению генетических конструкций выполнены в рамках проекта № 18-29-09151, работа с культурами клеток проведена в рамках проекта № 17-04-01555.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Hassan H.T. // *Leuk. Res.* 2009. V. 33. № 1. P. 5–10.
- Tabone S., Théou N., Wozniak A., Saffroy R., Deville L., Julié C., Callard P., Lavergne-Slove A., Debiec-Rychter M., Lemoine A., et al. // *Biochim. Biophys. Acta – Mol. Basis Dis.* 2005. V. 1741. № 1–2. P. 165–172.
- Krams M., Parwaresch R., Sipos B., Heidorn K., Harms D., Rudolph P. // *Oncogene.* 2004. V. 23. № 2. P. 588–595.
- Thorén L.A., Liuba K., Bryder D., Nygren J.M., Jensen C.T., Qian H., Antonchuk J., Jacobsen, S.-E.W. // *J. Immunol. Am. Ass. Immunol.* 2008. V. 180. № 4. P. 2045–2053.
- Growney J.D., Clark J.J., Adelsperger J., Stone R., Fabbro D., Griffin J.D., Gilliland D.G. // *Blood. Am. Soc. Hematol.* 2005. V. 106. № 2. P. 721–724.
- Ustun C., DeRemer D.L., Akin C. // *Leuk. Res. Pergamon.* 2011. V. 35. № 9. P. 1143–1152.
- Wang Y.-Y., Zhao L.-J., Wu C.-F., Liu P., Shi L., Liang Y., Xiong S.-M., Mi J.-Q., Chen Z., Ren R., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005. V. 102. № 4. P. 1104–1109.
- Kindler T., Breitenbuecher F., Marx A., Beck J., Hess G., Weinkauff B., Duyster J., Peschel C., Kirkpatrick C.J., Theobald M., et al. // *Blood. Am. Soc. Hematol.* 2004. V. 103. № 10. P. 3644–3654.
- Cammenga J., Horn S., Bergholz U., Sommer G., Besmer P., Fiedler W., Stocking C. // *Blood.* 2005. V. 106. № 12. P. 3958–3961.
- Gordon P.M., Dias S., Williams D.A. // *Leukemia.* 2014. V. 28. № 11. P. 2257–2260.
- Gaikwad A., Prchal J.T. // *Exp. Hematol.* 2007. V. 35. № 11. P. 1647–1656.
- McCallum L., Price S., Planque N., Perbal B., Pierce A., Whetton A.D., Irvine A.E. // *Blood.* 2006. V. 108. № 5. P. 1716–1723.