

УДК 577.29

Подавление EGFR ингибирует сферообразование клеток культуры MCF7 со сверхэкспрессией EGFR

Д. Д. Новак^{1#}, О. С. Троицкая^{1#*}, А. А. Нуштаева¹, М. В. Жильникова^{1,2}, В. А. Рихтер¹, М. И. Мещанинова¹, О. А. Коваль^{1,2}

¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, 630090 Россия

²Новосибирский государственный университет, Новосибирск, 630090 Россия

#Равный вклад.

*E-mail: troitskaya_olga@bk.ru

Поступила в редакцию 23.03.2023

Принята к печати 18.04.2023

DOI: 10.32607/actanaturae.17857

РЕФЕРАТ Рецептор эпидермального фактора роста (EGFR) – онкогенная тирозинкиназа, которая участвует в возникновении и прогрессировании опухоли, поэтому ингибиторы EGFR и моноклональные антитела к этому рецептору имеют большое значение в терапии опухолей. Экспрессия трансгена *EGFR* в линии клеток MCF7 (MCF7-EGFR) аденокарциномы молочной железы человека, как показано нами ранее, стимулирует рост клеток в виде 3D-сфероидов. В представленной работе изучено, влияет ли ингибирование EGFR на сборку сфероидов или приводит к разрушению уже сформированных сфероидов. Сравнили действие анти-EGFR siРНК, моноклонального антитела цетуксимаб против EGFR и ингибитора тирозинкиназы AG1478 на диссоциированные и целые сфероиды клеток MCF7-EGFR. Чувствительность клеток MCF7-EGFR к цитотоксическому действию цетуксимаба и AG1478 была в 2.5 раза выше, чем у клеток родительской линии MCF7. Обнаружено, что подавление мРНК EGFR с помощью siРНК уменьшало образование сфер, тогда как обработка уже сформированных сфероидов не вызывала такого эффекта. Обработка диссоциированных сфероидов цетуксимабом и AG1478 также тормозила образование сфер MCF7-EGFR. Мы предполагаем, что экспрессия EGFR важна по крайней мере на стадии формирования сфероидов. Обнаружено значительное увеличение уровня белка адгезии N-кадгерина при переходе от адгезивной клеточной культуры MCF7wt к сфероидам MCF7-EGFR. При воздействии siРНК и цетуксимаба на клетки MCF7-EGFR уровень N-кадгерина снижался. Таким образом, показано участие N-кадгерина в EGFR-зависимом образовании сфероидов MCF7-EGFR. Сфероиды MCF7-EGFR являются релевантной моделью для изучения агрессивных гормон-положительных опухолей молочной железы.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА 3D-культура клеток, сфероиды, MCF7, EGFR, siРНК, цетуксимаб, AG1478.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ EGFR – рецептор эпидермального фактора роста; siРНК – малая интерферирующая РНК; LF – Lipofectamine 3000; PI – йодид пропидия; wt – дикий тип; AG – ингибитор EGFR (AG1478); ДМСО – диметилсульфоксид; FDA – диацетат флуоресцеина; SD – стандартное отклонение; IC50 – концентрация препарата, при которой гибель клеток достигает 50%.

ВВЕДЕНИЕ

Взаимодействие различных факторов роста и их рецепторов регулирует автономный рост раковых клеток [1]; так эпидермальный фактор роста (EGF) и его рецептор (EGFR) играют важную роль в патогенезе и прогрессировании различных типов злокачественных опухолей [2]. EGFR (или HER1) входит в семейство рецепторных тирозинкиназ ErbB, которое также включает HER2, HER3 и HER4. EGFR содержит внеклеточный домен, гидрофобный транс-

мембранный домен, внутриклеточный каталитический тирозинкиназный домен и несколько внутриклеточных остатков тирозина [3].

В настоящее время в терапии опухолей используют два типа ингибиторов ErbB: моноклональные антитела против внеклеточного домена EGFR или HER2, такие, как цетуксимаб, матузумаб, панитумумаб, трастузумаб, пертузумаб, и ингибиторы тирозинкиназы, которые конкурируют за связывание в тирозинкиназном домене EGFR с молекулами

АТР, например, гефитиниб, эрлотиниб, лапатиниб, АЕЕ788 [4]. В 2004 году Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США впервые одобрило применение цетуксимаба при метастатическом колоректальном раке, а в 2011 году – в терапии рака головы и шеи [5, 6]. Цетуксимаб – рекомбинантное химерное моноклональное антитело IgG1 человек/мышь, которое связывается с рецептором эпидермального фактора роста. Конкурентное специфическое связывание цетуксимаба с EGFR ингибирует фосфорилирование рецептора, сигнальный путь EGFR и, как итог, пролиферацию опухолевых клеток [7].

Нокдаун терапевтически значимых генов-мишеней также может быть эффективной стратегией терапии опухолей. Ингибирование процессинга мРНК с помощью малых интерферирующих РНК (siРНК) рассматривается как один из способов блокирования специфической мишени. РНК-интерференция является защитным механизмом от попадающих в клетку экзогенных нуклеиновых кислот, например, вирусной РНК [8]. В настоящее время проходят доклинические и клинические испытания несколько агентов на основе siРНК, предназначенных для лечения рака предстательной железы и головного мозга [9].

Ранее нами была получена линия клеток MCF7 аденокарциномы молочной железы человека с повышенной экспрессией EGFR и установлено, что избыток EGFR в клетках MCF7 приводит к спонтанному образованию сфер в стандартных условиях культивирования [10, 11]. Сфероиды MCF7-EGFR имеют округлую форму с четко выраженной внешней границей и медианным диаметром, равным 100 мкм; размер крупных сфероидов может превышать 400 мкм. Поскольку нами показано, что продукция EGFR влияет на адгезионные свойства клеток MCF7-EGFR, можно предположить, что ингибирование EGFR может вызывать разрушение сформированных сфероидов или подавлять сборку сфероидов из отдельных клеток. Чтобы подтвердить эту гипотезу, мы изучили влияние анти-EGFR siРНК, цетуксимаба и ингибитора тирозинкиназы AG1478 на структуру и формирование сфероидов MCF7-EGFR.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Клеточные линии

В работе использовали клеточные линии аденокарциномы молочной железы человека MCF7wt (#ACC 115, Германия) и MDA-MB-231 (#ACC 732, Германия). Клетки культивировали в виде монослойной культуры в среде IMDM или DMEM со-

ответственно, содержащей 10% FBS и 1% пенициллина-стрептомицина-амфотерицина (далее – полная среда), как описано ранее [12].

Клеточная линия аденокарциномы молочной железы человека MCF7-EGFR, формирующая сфероиды, описана ранее [10]. Сфероиды MCF7-EGFR культивировали в стандартных условиях в планшетах с неадгезивным покрытием (Nest Bio-technology Co., Китай).

Сферообразование и подсчет сфероидов

Для построения кинетических кривых сферообразования клетки диссоциировали с помощью реагента Stempro™ Accutase™ (Gibco, США), высевали в количестве 3×10^4 клеток/лунку в 48-луночный планшет с неадгезивным покрытием (Eppendorf, Германия) и культивировали в стандартных условиях как описано выше. Сфероиды подсчитывали в трех или шести независимых лунках планшета с использованием инвертированного микроскопа (Eclipse Ti, Nikon, Япония) при 40-кратном увеличении. В светлом поле подсчитывали все свободно плавающие сфероиды, размер которых превышал 30 мкм. Затем рассчитывали среднее количество сфероидов на лунку и стандартное отклонение (SD). Предварительный подсчет во всех экспериментах проводили с использованием программного обеспечения ImageJ (версия 1.52a, США) (данные не приведены). Точное количество сфероидов рассчитывали вручную.

Конструирование анти-EGFR siРНК

Для оценки ингибирования EGFR на сфероидах MCF7-EGFR были сконструированы siРНК на основе последовательностей, описанных в работе [13]. Синтез олигонуклеотидов проводили в лаборатории химии РНК ИХБФМ СО РАН. Использовали следующие siРНК: senScr 5'-CAA GUC UCG UAU GUA-GUG GUU-3', antiScr 5'-CCA CUA UAU ACG AGA-CUU GUU-3', senEGFR 5'-GUC CGC AAG UGU-AAG AAG UTT-3', antiEGFR 5'-ACU UCU UAC ACU-UGC GGA CTT-3'. Средняя концентрация рибоолигонуклеотидов в растворе составляла 0.203 мМ.

Гибридизация siРНК

Эквимольные количества sen- и anti-цепей siРНК смешивали с 5-кратным буфером для гибридизации siРНК (100 мМ $C_2H_3NaO_2$, 30 мМ HEPES-KOH, 2 мМ $Mg(CH_3COO)_2$, pH 7.4) в соотношении 2:2:1. Образцы нагревали на водяной бане в течение 2 мин при 90°C и охлаждали до комнатной температуры. К полученной смеси добавляли два объема $1 \times$ буфера для гибридизации siРНК. Конечная концентрация siРНК-дуплексов составила 27 мкМ.

Трансфекция клеток siРНК

Трансфекцию siРНК проводили с использованием реагента Lipofectamine 3000 (Invitrogen, США) в соответствии с протоколом производителя. Клетки высевали за 24 ч до эксперимента, обрабатывали 100 нМ siРНК и инкубировали в течение 4 ч при 37°C, после чего среду заменяли на полную среду, подходящую для данной культуры клеток, и продолжали культивирование.

Анализ выживаемости клеток

Жизнеспособность клеток определяли через 72 ч после обработки препаратом с помощью МТТ-теста как описано в [12]. Значения IC₅₀ рассчитывали с помощью программного обеспечения CompuSyn версии 1.0.

Исходный раствор (5 мг/мл) цетуксимаба Эрбитукс® (Merck Healthcare, Германия) хранили при +4°C. Для экспериментов на культуре клеток цетуксимаб разводили в полной среде IMDM. Исходный раствор (31.7 мМ) AG1478 (Sigma-Aldrich, США) в ДМСО:MeOH (1:1) хранили при -20°C. Для экспериментов на культуре клеток AG1478 разводили в полной среде IMDM так, чтобы концентрация ДМСО в лунках составляла 0.5%.

Окрашивание FDA

Исходный раствор (1 мг/мл) диацетата флуоресцеина – FDA (Sigma-Aldrich, США), разведенного в ДМСО, хранили при -20°C. Раствор добавляли в культуральную среду до конечной концентрации вещества – 10 мкг/мл. Сфероиды инкубировали в полной среде IMDM с растворенным FDA в течение 30 мин. После этого сфероиды собирали центрифугированием и промывали PBS. Жизнеспособность клеток и цитотоксичность анализировали с использованием флуоресцентного микроскопа (Eclipse Ti, Япония) и проточной цитометрии.

Проточная цитометрия

После обработки препаратом сфероиды диссоциировали с помощью реагента Stempro™ Accutase™, промывали в PBS и инкубировали с антителами к EGFR для определения уровня EGFR. Клетки для анализа жизнеспособности инкубировали с йодидом пропидия (PI) или FDA в соответствии с протоколом производителя. Использовали следующие антитела: моноклональные антитела IgG мыши к белку EGFR (Invitrogen, США), вторичные антитела, конъюгированные с флуоресцентной меткой Alexa Fluor 647 (Abcam, Великобритания). Все анализы выполняли с использованием проточного цитометра FACSCantoII (BD Biosciences, США), данные анализировали с помощью программного обеспече-

ния FACSDiva (BD Biosciences, США). Популяции клеток выделяли с использованием прямого и бокового светорассеяния, чтобы исключить мелкие частицы. В каждом эксперименте собирали не менее 10000 событий.

Вестерн-блот-анализ

Вестерн-блот-анализ проводили согласно протоколу, описанному в [14]. Клетки лизировали, измеряли концентрацию белка, после чего образцы (15 мкг) разделяли с помощью 10% SDS-PAGE и переносили на мембрану PVDF. Мембрану блокировали раствором 5% сухого молока, инкубировали последовательно с первичными и вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена. Использовали следующие антитела: первичные антитела IgG к актину (Sigma-Aldrich, США), EGFR (Santa Cruz Biotechnology, США), SNAIL + SLUG (Abcam), N-кадгерину (Invitrogen, США), E-кадгерину (Abcam) и конъюгаты вторичных антител с пероксидазой хрена к антигенам кролика (Thermo Fisher, США) и мыши (Thermo Fisher). Хемилюминесцентный сигнал регистрировали с помощью набора реагентов Novex ECL HRP (Invitrogen) и прибора GE Amersham Imager 600 (GE, США). Денситометрический анализ вестерн-блотов проводили с использованием программного обеспечения для анализа изображений GelAnalyser версии 2010a.

Статистический анализ

Результаты представлены как среднее арифметическое \pm SD для выборки. Статистический анализ проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние анти-EGFR siРНК на сфероиды MCF7-EGFR

Влияние понижения экспрессии EGFR на образование сфероидов MCF7-EGFR мы оценили с использованием анти-EGFR siРНК. Используя международную базу данных NCBI Nucleotide установлено, что выбранная анти-EGFR siРНК комплементарна последовательности экзона 8 гена *EGFR* человека. Этот экзон кодирует фрагмент субдомена III EGFR, отвечающего за связывание рецептора с лигандом [15].

Сфероиды MCF7-EGFR диссоциировали на отдельные клетки, а затем высевали в планшеты с 100 нМ анти-EGFR siРНК. В качестве трансфицирующего агента использовали Lipofectamine 3000

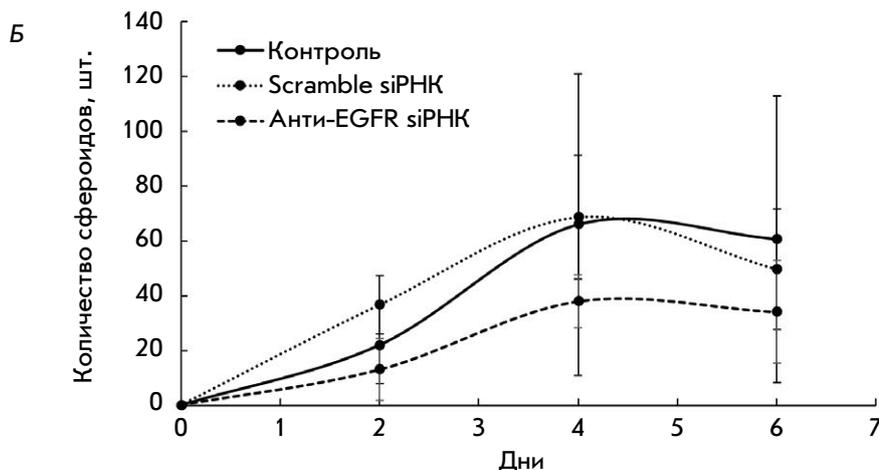
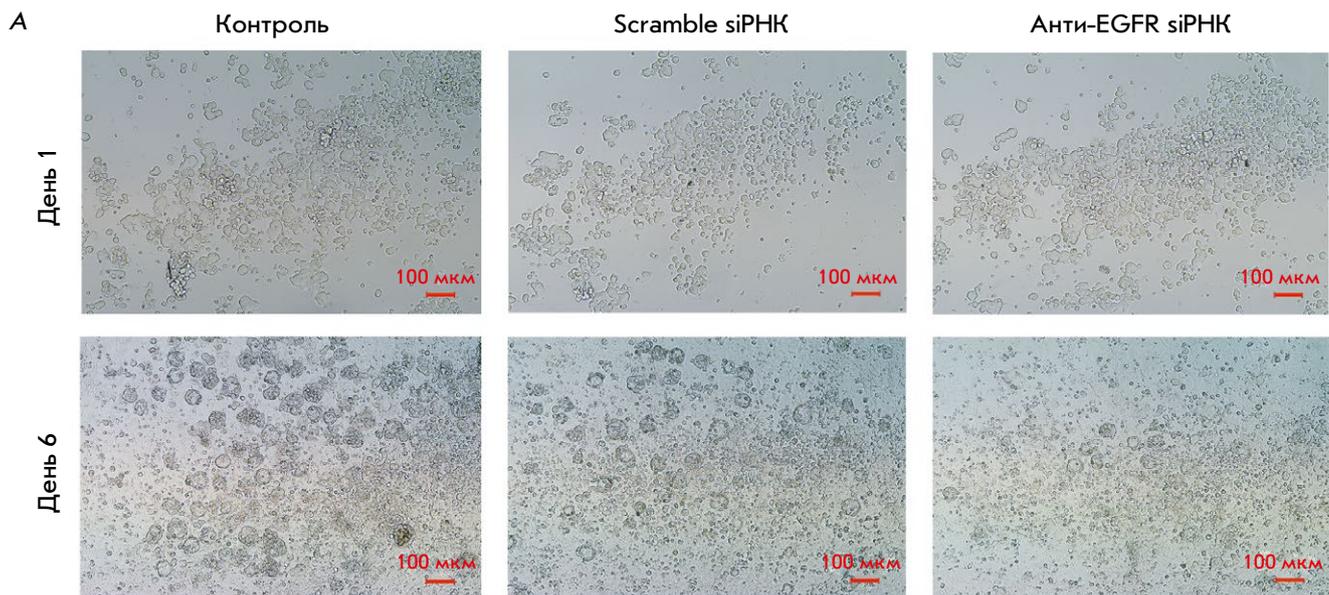


Рис. 1. Влияние анти-EGFR siRNA на образование сфероидов MCF7-EGFR. А – фотографии контрольных и обработанных siRNA сфероидов MCF7-EGFR. Б – динамика роста сфероидов MCF7-EGFR. Разрушенные сфероиды высевали в 48-луночные планшеты, обрабатывали siRNA (100 нМ) и подсчитывали в отдельных лунках с указанием числа сфероидов на лунку. Контрольные клетки обрабатывали LF

(LF). SiRNA, имеющую случайную последовательность (Scramble siRNA), использовали в качестве отрицательного контроля, а клетки, обработанные только LF, – в качестве контроля цитотоксической активности LF. Динамику роста и образования сфер после обработки siRNA и в контрольных образцах оценивали методом автоматического и прямого подсчета сфер. Обработка клеток анти-EGFR siRNA приводила к уменьшению числа сфероидов по сравнению с контрольными клетками и клетками, обработанными Scramble siRNA (рис. 1А,Б).

Уровень общего клеточного EGFR в клетках MCF7-EGFR был почти в 10 раз выше, чем в клетках MCF7wt (рис. 2В,Г). Нокдаун EGFR под действием анти-EGFR siRNA оценивали методом проточной цитометрии и вестерн-блотинга, используя антитела к поверхностному и внутреннему доменам белка соответственно. Показано, что снижение уровня поверхностного EGFR на вторые сутки после об-

работки siRNA сфероидов MCF7-EGFR составило примерно 20–25% (рис. 2). Данные вестерн-блотинга хорошо согласуются с результатами определения уровня поверхностного EGFR в клетках, обработанных siRNA.

Чтобы выявить влияние анти-EGFR siRNA на сформированные структуры, сфероиды EGFR-MCF7 помещали в неадгезивный планшет, а затем инкубировали с siRNA. Обнаружено, что анти-EGFR siRNA не влияла на структуру сфероидов (рис. 3). Обычно для эффективного ингибирования экспрессии белка-мишени используют siRNA в концентрации 20–200 нМ [16–18]. Однако siRNA могут хуже проникать в сфероиды, чем в клетки, растущие в монослое, поэтому в экспериментах со сфероидом часто используют более высокие концентрации siRNA или проводят трансфекцию в среде с сывороткой [19, 20]. В нашем исследовании увеличение концентрации анти-EGFR siRNA до 200 нМ

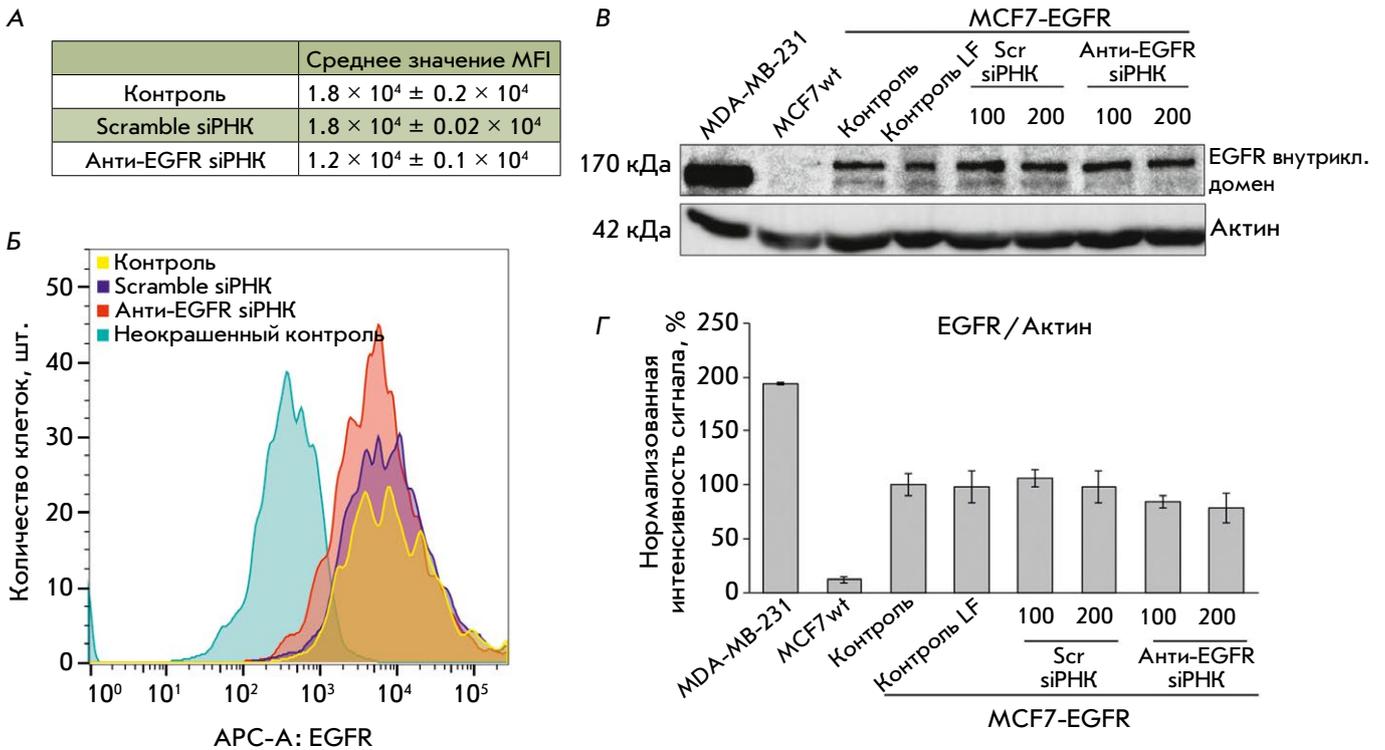


Рис. 2. Оценка снижения уровня EGFR в клетках MCF7-EGFR под действием анти-EGFR siPHK. **А** – количественная оценка клеточной популяции EGFR⁺. Данные представлены как средняя интенсивность флуоресценции (MFI) EGFR⁺-клеток по отношению к контрольным клеткам \pm SD по двум независимым экспериментам. **Б** – репрезентативное изображение цитометрического анализа. **В, Г** – изменения уровня EGFR после обработки анти-EGFR siPHK. В качестве контрольных клеточных линий использовали MDA-MB-231, MCF7 wt. Сфероиды MCF7-EGFR диссоциировали и обрабатывали Scramble siPHK, анти-EGFR siPHK (100–200 нМ) в течение 48 ч. **В** – репрезентативные изображения вестерн-блот-анализа. **Г** – Вестерн-блот-анализ EGFR/актин в клетках

не приводило к дополнительному снижению уровня EGFR. Проведение трансфекции в среде с сывороткой не повышало эффективность подавления EGFR в сфероиде MCF7-EGFR (данные не приведены). Дальнейшая оптимизация трансфекции сфероидов MCF7-EGFR с помощью siPHK представляется нам весьма актуальной.

На основании полученных данных можно сделать вывод, что подавление EGFR специфическими siPHK на стадии сборки сфероидов приводит к снижению темпа сферообразования в культуре MCF7-EGFR. В то же время подавление EGFR в зрелых сфероиде не приводит к их разрушению.

Влияние цетуксимаба на клетки MCF7wt и зрелые сфероиды MCF7-EGFR

Поскольку связывание цетуксимаба с мишенью вызывает гибель клеток, этот препарат применяют в иммунотерапии EGFR-положительных злокачественных новообразований [21]. Оценили цитотоксическую активность цетуксимаба в отношении сфероидов MCF7-EGFR: к сфероиде добавляли препарат (25–200 мкг/мл) и продолжали культу-

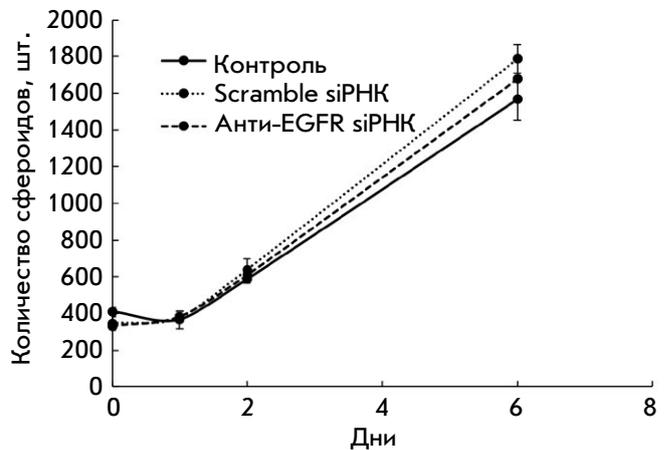


Рис. 3. Анализ воздействия анти-EGFR siPHK на структуру сфероидов MCF7-EGFR. Кинетика роста сфероидов MCF7-EGFR. Целые сфероиды высевали, обрабатывали siPHK (100 нМ) и подсчитывали в отдельных лунках 24-луночных планшетов с указанием числа сфероидов на лунку. Контрольные сфероиды обрабатывали LF. Данные представлены как среднее \pm SD трех независимых экспериментов

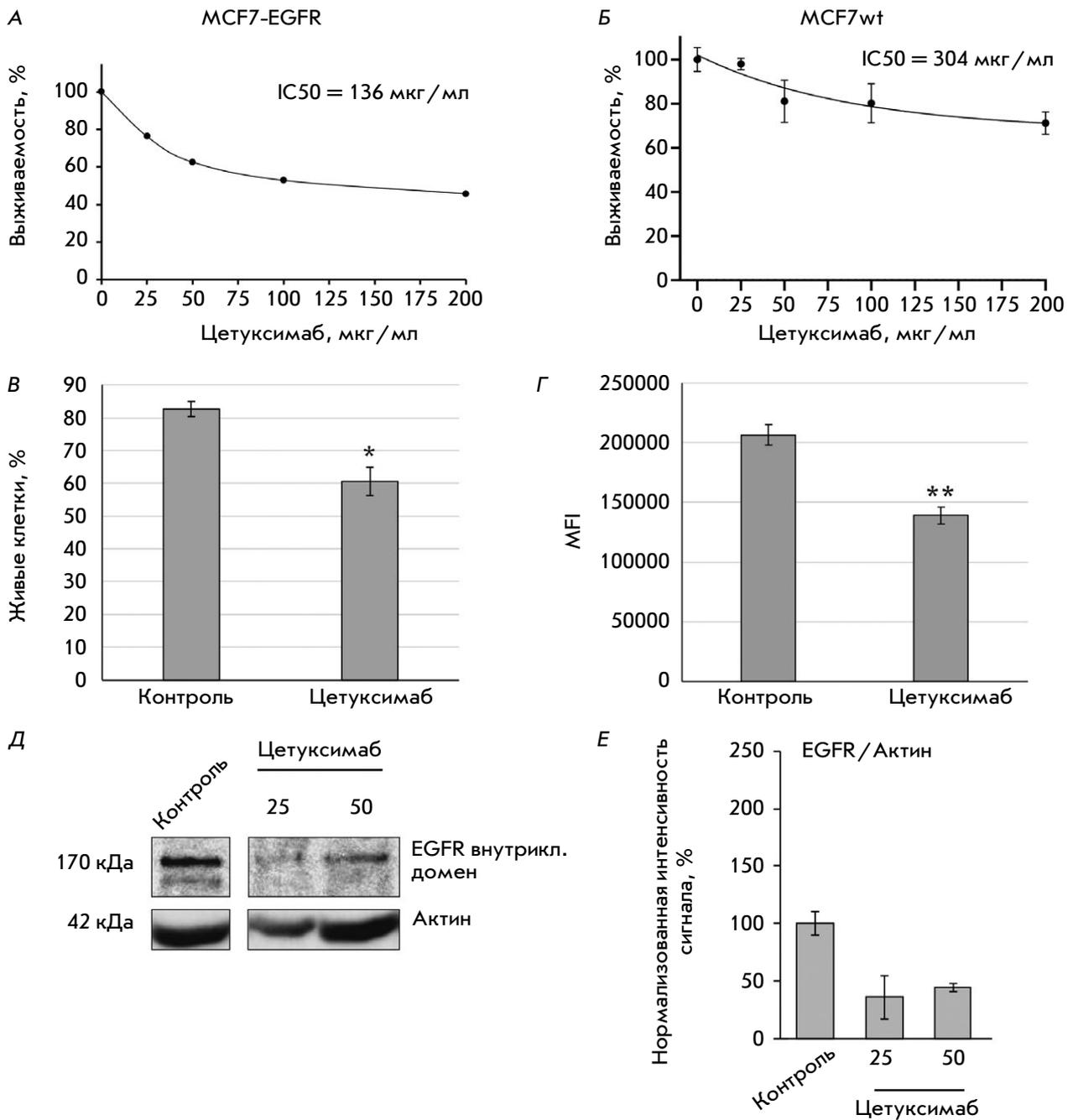


Рис. 4. Цитотоксическая активность цетуксимаба в отношении сфероидов MCF7-EGFR (А) и клеток MCF7 дикого типа (Б). Определение значений IC50 по данным МТТ-анализа. В, Г – оценка доли живых клеток сфероидов MCF7-EGFR после обработки цетуксимабом методом проточной цитометрии. Клетки MCF7-EGFR инкубировали с цетуксимабом (50 мкг/мл) в течение 72 ч и окрашивали FDA. В – средний % живых клеток ± SD двух независимых экспериментов. Г – MFI – средняя интенсивность флуоресценции живых клеток. Различия были значимыми при * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. Д, Е – изменения уровня EGFR после обработки цетуксимабом. Сфероиды MCF7-EGFR диссоциировали и обрабатывали цетуксимабом (25–50 мкг/мл) в течение 48 ч. Д – репрезентативные изображения вестерн-блот-анализа. Е – Вестерн-блот-анализ EGFR/актин в клетках

вировать в стандартных условиях в течение 72 ч. После этого клетки окрашивали йодистым пропидием (PI) и методом проточной цитометрии определяли процент PI-негативных клеток, что соответствует

популяции живых клеток (рис. 4А). Значение IC50 цетуксимаба составило 136 мкг/мл для сфероидов MCF7-EGFR и 304 мкг/мл для клеток родительской линии MCF7wt, что в 2.5 раза выше, чем в случае

клеток сфероидов MCF7-EGFR, и свидетельствует об устойчивости клеток к препарату (рис. 4Б). Сравнение экспериментальных значений IC50 с опубликованными данными для других EGFR-положительных опухолевых клеток, например рака легкого A549 (IC50 = 146 мкг/мл) [22], позволяет охарактеризовать клеточную линию MCF7-EGFR как чувствительную к цетуксимабу. Таким образом, клетки сфероидов MCF7-EGFR, культивируемые в стандартных условиях, доступны для воздействия цетуксимаба.

Поскольку в задачи исследования входила оценка эффекта цетуксимаба на сферы, отличного от цитотоксического, далее использовали концентрацию цетуксимаба, меньшую, чем значение IC25. Для визуализации живых клеток использовали диацетат флуоресцеина (FDA) – субстрат эстеразы, способный проникать в клетку. FDA можно использовать в качестве инструмента для анализа жизнеспособности, который измеряет как ферментативную активность, так и целостность клеточной мембраны [23]. Сфероиды MCF7-EGFR обрабатывали цетуксимабом (50 мкг/мл) в течение 72 ч и окрашивали FDA. С помощью проточной цитометрии клеток, обработанных цетуксимабом, выявлено снижение популяции живых клеток до 20% от значений в контроле (рис. 4В,Г). В образцах сфероидов, к которым не добавляли цитотоксический агент, также присутствовали погибшие клетки, наличие которых можно объяснить формированием некротического ядра сфероидов, вызванным недостатком транспорта кислорода и питательных веществ, как описано нами ранее [10]. Цетуксимаб сильнее снижал уровень EGFR, чем анти-EGFR siРНК: до 60% относительно необработанных клеток MCF7-EGFR (рис. 4Д,Е).

Добавление цетуксимаба на стадии диссоциированных сфероидов снижает образование сфер MCF7-EGFR

Чтобы подтвердить способность цетуксимаба ингибировать образование сфероидов MCF7-EGFR, мы оценили динамику сферообразования после обработки цетуксимабом. Сфероиды MCF7-EGFR диссоциировали и культивировали в стандартных условиях в присутствии цетуксимаба (50 мкг/мл). Обработка цетуксимабом вела к полному подавлению образования сфер на шестые сутки культивирования (рис. 5).

Также мы оценивали влияние цетуксимаба на сформированные сфероиды. Сфероиды MCF7-EGFR высевали на неадгезионный культуральный планшет в среде с добавлением цетуксимаба (50 мкг/мл) на 72 ч. Обработка цетуксимабом приводила к уменьшению количества сфероидов, что сви-

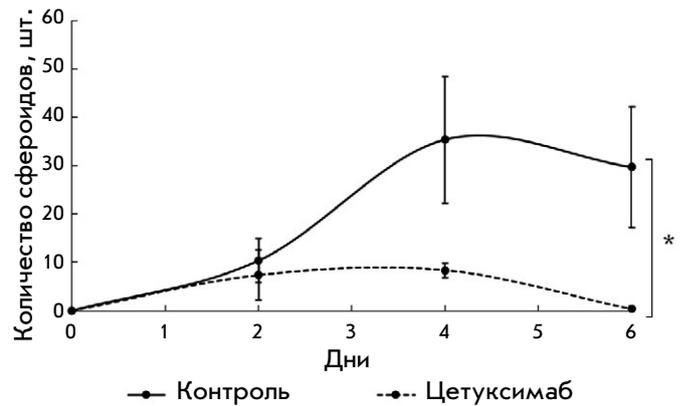


Рис. 5. Анализ влияния цетуксимаба на сферообразование MCF7-EGFR. Сфероиды диссоциировали, высевали в 48-луночный неадгезионный планшет, обрабатывали цетуксимабом (50 мкг/мл) и подсчитывали их количество в отдельных лунках. Данные представлены как среднее значение \pm SD трех независимых экспериментов; * $p < 0.05$

детельствует о стимуляции разрушения сфероидов MCF7-EGFR при ингибировании EGFR (рис. 6А,Б). Сфероиды, обработанные цетуксимабом и окрашенные FDA, анализировали с помощью флуоресцентной микроскопии. Показано, что в присутствии цетуксимаба появилось много отдельных клеток, а число крупных и структурированных сфероидов уменьшалось по сравнению с контролем (рис. 6В).

После воздействия ингибитора цетуксимаба количество сфер снижалось по сравнению с необработанными образцами, и этот эффект показан как для диссоциированных сфероидов, так и уже сформированных сфер. Мы считаем, что цетуксимаб оказывает преимущественно стойкое антипролиферативное действие как в новых, так и в уже существующих сфероидах. В отличие от siРНК, эффективность доставки цетуксимаба в клетки внутреннего слоя сфероида не вызывает сомнений, так как эффекты цетуксимаба подтверждены на организменном уровне [5].

Влияние AG1478 на образование сфер клетками MCF7-EGFR

Мы проанализировали действие на клетки MCF7-EGFR ингибитора EGFR – тирфостина (AG1478, или AG), который ингибирует связывание молекул АТФ с внутриклеточным доменом рецептора. Значение IC50 AG1478 для клеток MCF7 дикого типа было почти вдвое выше, чем для клеток MCF7-EGFR (рис. 7А,Б). Таким образом, показано изменение чувствительности клеток MCF7-EGFR к EGFR-ингибирующим агентам по сравнению с клетками MCF7wt.

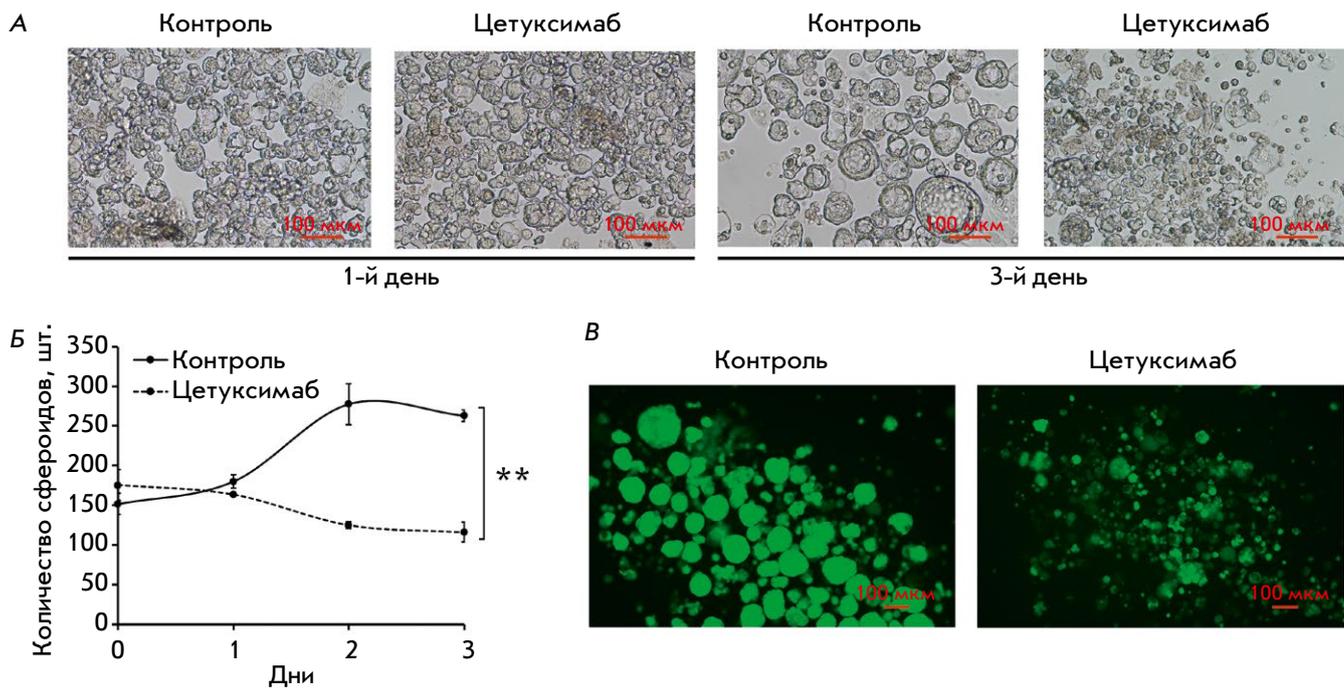


Рис. 6. Влияние цетуксимаба на структуру сфероидов MCF7-EGFR. А – фотографии контрольных и обработанных цетуксимабом сфероидов MCF7-EGFR. Б – кинетика роста сфероидов MCF7-EGFR, культивируемых в среде с цетуксимабом и без него. Целые сфероиды высевали, обрабатывали цетуксимабом (50 мкг/мл), подсчитывали в отдельных лунках 48-луночного планшета и указывали количество сфероидов на лунку. Данные представлены как среднее значение \pm SD трех независимых экспериментов; $**p < 0,01$. В – микроскопический анализ сфероидов MCF7-EGFR, обработанных цетуксимабом в течение 72 ч и окрашенных FDA

Для анализа влияния AG1478 на сферообразование сфероиды MCF7-EGFR диссоциировали, высевали в планшеты и через 24 ч культивирования добавляли к клеткам AG1478 (10 мкМ). Обработка AG1478 значительно снижала количество сфероидов по сравнению с контрольными клетками (рис. 7B).

Влияние siРНК и цетуксимаба на уровень белков адгезии и белков-регуляторов эпителиально-мезенхимального перехода

Рао и соавт. показали, что EGFR регулирует активацию интегрина и пространственную организацию фокальных спаек [24]. Поэтому представляет интерес изучение взаимосвязи между уровнем EGFR и образованием сфер, когда между клетками формируются не только горизонтальные, но и вертикальные взаимодействия и происходят существенные изменения адгезионных свойств. Важным компонентом, контролирующим взаимодействие между клетками и их окружением, является клеточная адгезия. Показано, что EGFR может дестабилизировать адгезию, опосредованную E-кадгеринами, усиливая эндоцитоз E-кадгерина, модифицируя его взаимодействие с цитоскелетом и снижая его экспрессию, тем самым способствуя онкогенезу [25].

Чтобы сравнить влияние анти-EGFR-агентов на уровень определенных белков в сфероидах MCF7-EGFR, обработанных siРНК или цетуксимабом, и в родительских клетках MCF7wt мы проанализировали уровень SNAIL/SLUG, N-кадгерина и E-кадгерина методом вестерн-блоттинга.

Транскрипционные факторы SNAIL и SLUG участвуют в регуляции эпителиально-мезенхимального перехода, важного фактора в трехмерных моделях [26]. Мы не обнаружили различий в базовом уровне белков SNAIL/SLUG между клеточными линиями MCF7wt и MCF7-EGFR. Инкубация с siРНК не влияла на уровень SNAIL/SLUG, но обработка цетуксимабом приводила к двукратному увеличению уровня SNAIL/SLUG в клетках MCF7-EGFR (рис. 8A,B).

Соотношение N-кадгерина и E-кадгерина в клетке считается важным фактором, определяющим межклеточную адгезию и образование сфероидов [27]. Нами обнаружено, что базовый уровень N-кадгерина в клеточной линии MCF7-EGFR был более чем в 5 раз выше, чем в исходной клеточной линии MCF7wt. Обработка анти-EGFR-агентами приводила к снижению уровня N-кадгерина в сфероидах MCF7-EGFR (рис. 9A,B). Базовый уровень E-кадгерина в клетках MCF7-EGFR не отличался статистически значимо от уровня в сферои-

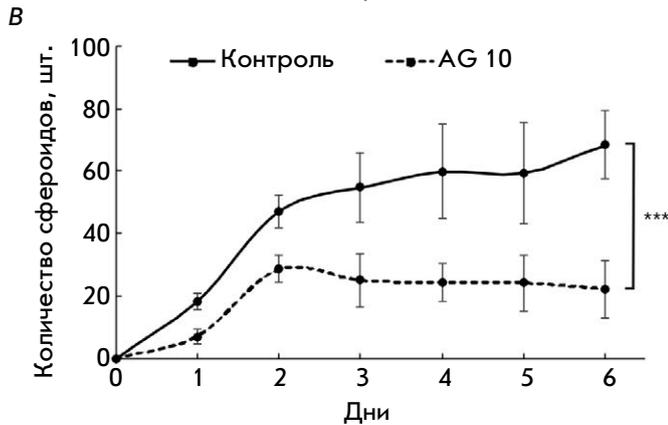
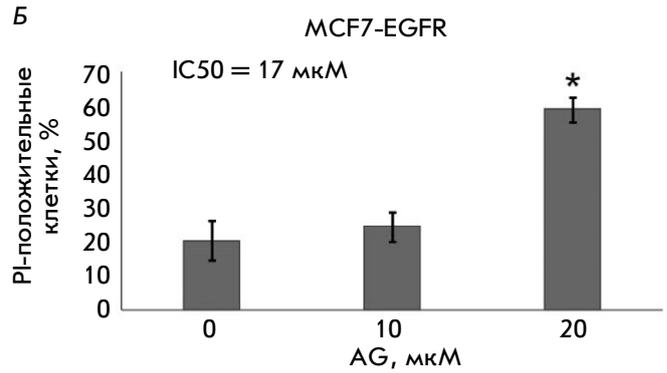
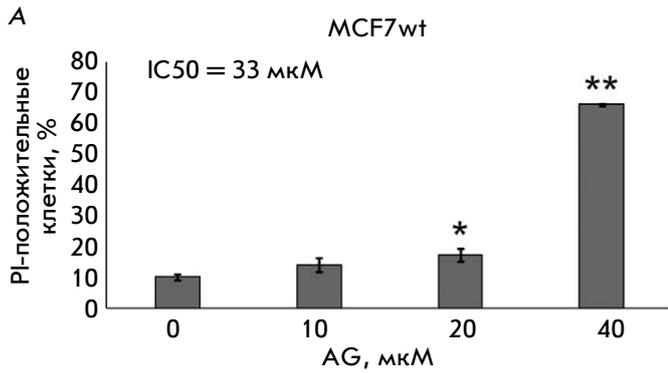


Рис. 7. Цитотоксическая активность AG 1478 (AG) в отношении клеток MCF7wt (А) и сфероидов MCF7-EGFR (Б). Клетки MCF7wt или сфероиды MCF7-EGFR инкубировали с AG (10–40 мкМ) в течение 5 дней. Контрольные клетки обрабатывали ДМСО. После обработки сфероиды диссоциировали, окрашивали PI и анализировали с помощью проточной цитометрии. Данные представлены как средний % PI-положительных клеток ± SD двух независимых экспериментов. В – кривые роста сфероидов MCF7-EGFR. Разрушенные сфероиды высеивали в 48-луночные планшеты и после 24 ч инкубации обрабатывали AG (10 мкМ). Подсчитывали количество сфероидов в отдельных лунках. Данные представлены как среднее значение ± SD шести независимых экспериментов. Статистические различия между контрольной и опытной группами обозначены * при $p < 0.05$, ** при $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

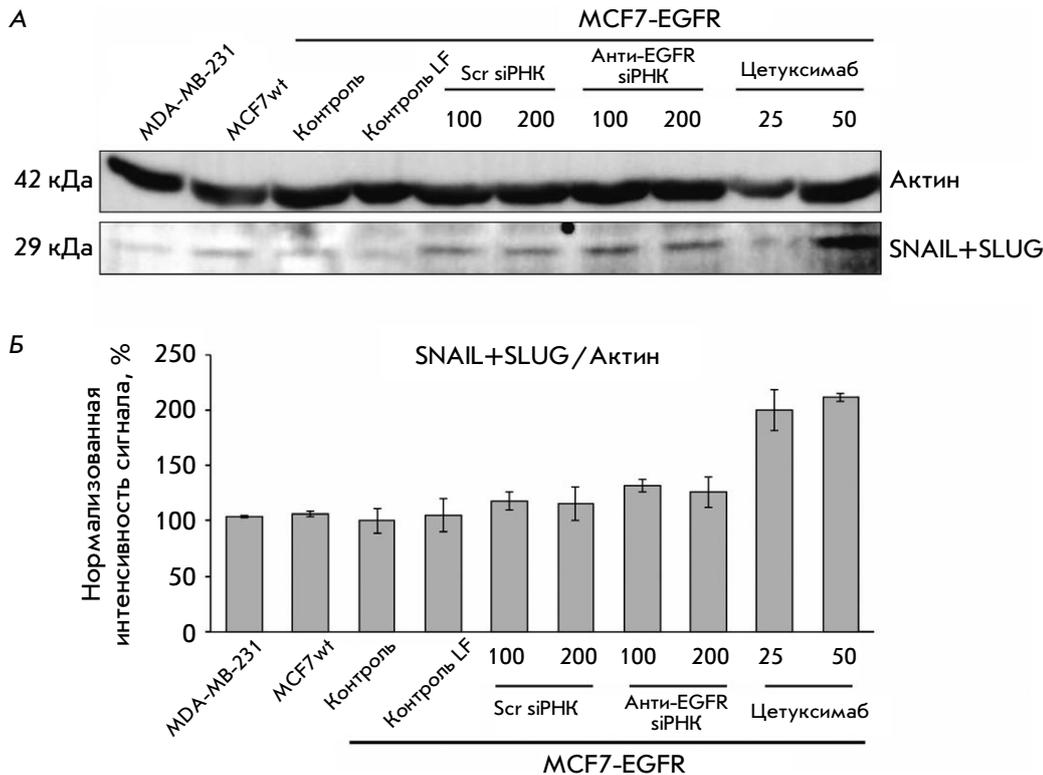


Рис. 8. Изменения клеточных белков после обработки анти-EGFR siPHK и цетуксимабом. В качестве контрольных клеточных линий использовали MDA-MB-231, MCF7wt. Сфероиды MCF7-EGFR диссоциировали и обрабатывали Scramble siPHK, анти-EGFR siPHK (100–200 нМ) или цетуксимабом (25–50 мкг/мл) в течение 48 ч. А – репрезентативные изображения вестерн-блотов. Б – Вестерн-блот-анализ SNAIL+SLUG / актина в клетках

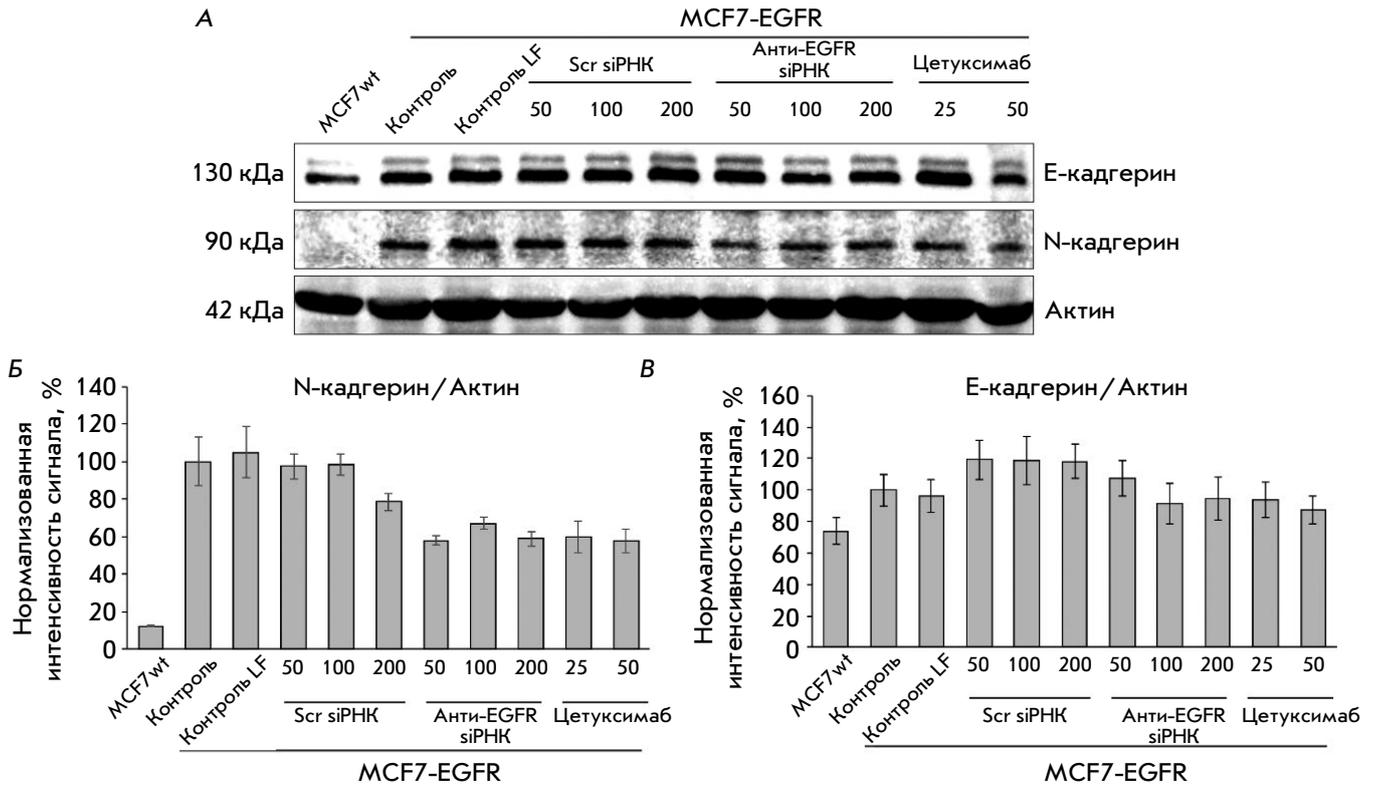


Рис. 9. Изменения клеточных белков после обработки анти-EGFR siРНК и цетуксимабом. В качестве контрольных клеточных линий использовали MDA-MB-231, MCF7 wt. Сфероиды MCF7-EGFR диссоциировали с помощью акустазы и обрабатывали Scramble siРНК (scr siРНК), анти-EGFR siРНК (50–200 нМ) или цетуксимабом (25–50 мкг/мл) в течение 48 ч. Репрезентативные изображения результатов вестерн-блот-анализа (А). Вестерн-блот-анализ N-кадгерина/актина (Б) и E-кадгерина/актина (В)

дах MCF7-EGFR. Более того, уровень E-кадгерина в сфероидах MCF7-EGFR не зависел от добавления анти-EGFR siРНК или цетуксимаба (рис. 9А,В).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нами обнаружено, что тирозинкиназный рецептор EGFR участвует в поддержании образования сфер клеток MCF7-EGFR. Значение EGFR для формирования сфероидов подтверждено в экспериментах с ингибиторами EGFR. Показано, что подавление EGFR на стадии отдельных клеток снижало сферообразование, тогда как обработка уже сформированных сфероидов такого эффекта не выявила. Мы предполагаем, что экспрессия EGFR важна, по крайней мере, на стадии формирования сфероидов. Чтобы получить значительный эффект нокдауна гена EGFR с применением siРНК на больших сфероидов, необходимо повысить эффективность системы трансфекции. Также показано, что переход клеток MCF7-EGFR в трехмерные структуры связан с значительным повышением экспрессии белка N-кадгерина. На основании полученных данных

мы предполагаем, что образование сфер клетками MCF7-EGFR частично связано с клеточными путями, регулируемыми эпителиально-мезенхимальный переход. Полученные результаты, по-видимому, частично обусловлены свойствами клеток MCF7, поскольку клетки MDA-MB-231 с высоким уровнем EGFR не образуют сфероидов без добавления факторов роста и матриц. Тем не менее, разработка такой клеточной модели с аномальной активацией N-кадгерина важна для выявления потенциальных молекулярных мишеней опухолевой прогрессии. Более того, сфероиды MCF7-EGFR могут служить моделью для тестирования терапевтических эффектов комбинации ингибиторов EGFR и N-кадгерина. ●

Исследование поддержано грантом РФФ № 20-74-10039 (культивирование раковых клеток и сфероидов), грантом правительства Новосибирска № 7 (Гр-7) (эксперименты с siРНК) и проектом бюджетного финансирования № 121030200173-6 (эксперименты с цетуксимабом).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sporn M.B., Roberts A.B. // *Nature*. 1985. V. 313. № 6005. P. 745–747.
2. Normanno N. // *Front. Biosci.* 2001. V. 6. № 1. P. d685.
3. Foley J., Nickerson N.K., Nam S., Allen K.T., Gilmore J.L., Nephew K.P., Riese D.J. // *Semin. Cell Dev. Biol.* 2010. V. 21. № 9. P. 951–960.
4. Hynes N.E., Lane H.A. // *Nat. Rev. Cancer*. 2005. V. 5. № 5. P. 341–354.
5. Chidharla A., Parsi M., Kasi A. *StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publ.*, 2022.
6. Kirkpatrick P., Graham J., Muhsin M. // *Nat. Rev. Drug Discov.* 2004. V. 3. № 7. P. 549–550.
7. Brand T.M., Iida M., Wheeler D.L. // *Cancer Biol. Therapy*. 2011. V. 11. № 9. P. 777–792.
8. Setten R.L., Rossi J.J., Han S. // *Nat. Rev. Drug Discov.* 2019. V. 18. № 6. P. 421–446.
9. Hu B., Zhong L., Weng Y., Peng L., Huang Y., Zhao Y., Liang X.-J. // *Sig. Transduct. Target Ther.* 2020. V. 5. № 1. P. 101.
10. Troitskaya O., Novak D., Nushtaeva A., Savinkova M., Varlamov M., Ermakov M., Richter V., Koval O. // *IJMS*. 2021. V. 22. № 23. P. 12937.
11. Патракова Е.А., Бирюков М.М., Троицкая О.С., Новак Д.Д., Милахина Е.В., Гугин П.П., Закревский Д.Э., Швейгерт И.В., Коваль О.А. // *Цитология*. 2023. Т. 65. № 1. С. 39–53.
12. Koval O., Kochneva G., Tkachenko A., Troitskaya O., Sivolobova G., Grazhdantseva A., Nushtaeva A., Kuligina E., Richter V. // *BioMed. Res. Internat.* 2017. V. 2017. P. 1–14.
13. Zhang C., Yuan W., Wu Y., Wan X., Gong Y. // *Life Sci.* 2021. V. 266. P. 118886.
14. Nushtaeva A., Ermakov M., Abdurakhmanova M., Troitskaya O., Belovezhets T., Varlamov M., Gayner T., Richter V., Koval O. // *IJMS*. 2023. V. 24. № 3. P. 2494.
15. Saxon M.L., Lee D.C. // *J. Biol. Chem.* 1999. V. 274. № 40. P. 28356–28362.
16. Zhao M., Yang H., Jiang X., Zhou W., Zhu B., Zeng Y., Yao K., Ren C. // *Mol. Biotechnol.* 2008. V. 40. № 1. P. 19–26.
17. Hou K.K., Pan H., Ratner L., Schlesinger P.H., Wickline S.A. // *ACS Nano*. 2013. V. 7. № 10. P. 8605–8615.
18. Kilroy G., Burk D.H., Floyd Z.E. // *PLoS One*. 2009. V. 4. № 9. P. e6940.
19. Al-Husaini K., Elkamel E., Han X., Chen P. // *Can. J. Chem. Eng.* 2020. V. 98. № 6. P. 1240–1254.
20. Morgan R.G., Chambers A.C., Legge D.N., Coles S.J., Greenhough A., Williams A.C. // *Sci. Rep.* 2018. V. 8. № 1. P. 7952.
21. Baselga J. // *Eur. J. Cancer*. 2001. V. 37. P. 16–22.
22. Wang M., Chang A.Y.-C. // *Oncotarget*. 2018. V. 9. № 23. P. 16533–16546.
23. Szabó P., Jordan G., Kocsis T., Posta K., Kardos L., Šajn R., Aljagić J. // *Environ. Monit. Assess.* 2022. V. 194. № 9. P. 632.
24. Rao T.C., Pui-Yan Ma V., Blanchard A., Urner T.M., Grandhi S., Salaita K., Mattheyses A.L. // *J. Cell Sci.* 2020. P. jcs.238840.
25. Ramírez Moreno M., Bulgakova N.A. // *Front. Cell Dev. Biol.* 2022. V. 9. P. 828673.
26. Mikami S., Katsube K.-I., Oya M., Ishida M., Kosaka T., Mizuno R., Mukai M., Okada Y. // *Lab. Invest.* 2011. V. 91. № 10. P. 1443–1458.
27. Wang M., Ren D., Guo W., Huang S., Wang Z., Li Q., Du H., Song L., Peng X. // *Internat. J. Oncol.* 2016. V. 48. № 2. P. 595–606.