

На правах рукописи

Омельченко Денис Олегович

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СПОНТАННО ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЖИРОВОЙ ТКАНИ ЧЕЛОВЕКА

03.02.07 – Генетика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2014

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Медико-генетический научный центр» Российской академии медицинских наук

Научный руководитель:

Доктор биологических наук, профессор **Дмитрий Вадимович Гольдштейн**

Официальные оппоненты:

Асланян Марлен Мкртичович, доктор биологических наук, профессор, Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, профессор кафедры генетики биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова.

Ярыгин Константин Никитич, доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент РАМН, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича» Российской академии медицинских наук, заведующий лабораторией клеточной биологии.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова» Российской академии наук

Защита состоится «__» апреля 2014 г. в «___» часов на заседании Диссертационного ученого совета Д 001.016.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении «Медико-генетический научный центр» Российской академии медицинских наук (115478, Москва, ул. Москворечье, д. 1, www.med-gen.ru).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения «Медико-генетический научный центр» Российской академии медицинских наук по адресу: 115478, Москва, ул. Москворечье, д.1, www.med-gen.ru.

Автореферат разослан «__» _____ 2014 г.

Учёный секретарь диссертационного совета Д 001.016.01
по защите диссертаций на соискание ученой
степени кандидата наук, на соискание
ученой степени доктора наук,
доктор медицинских наук, профессор



Зинченко Рена Абульфазовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы

Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки жировой ткани (ММСК ЖТ) – это перспективный и популярный объект для генной инженерии и клеточной терапии.

Одним из важных вопросов при использовании стволовых клеток для терапии является их безопасность в отношении риска неопластической трансформации при выделении и ведении *ex vivo*. Неизбежно появляющиеся в ходе культивирования ММСК мутации могут привести к неопластической трансформации клеток. Поэтому перед трансплантацией необходимо удостовериться, что культивируемые ММСК не изменили своего фенотипа и не накопили мутации, способные инициировать неопластическую трансформацию и дать начало онкологическому заболеванию в организме после трансплантации.

Многочисленные исследования ММСК человека показывают противоречивую картину относительно вопроса оценки риска их спонтанной трансформации *in vitro* (Bentivegna A. et al., 2013). Описанные в литературе случаи, когда человеческие ММСК претерпевали спонтанную трансформацию в культуре, редки, и причины этого явления до сих пор не выявлены (Rubio D. et al., 2005; Zhou Y.F. et al., 2006; Rosland G.V. et al., 2009; Ning H.S. et al., 2009).

В лаборатории генетики стволовых клеток ФГБУ «МГНЦ» РАМН из первичных культур ММСК ЖТ человека, полученных от здоровых доноров, на ранних пассажах после выделения были изолированы клетки с характерными признаками неопластической трансформации. Результаты исследований морфо-функциональных характеристик таких клеток (Ржанинова А.А. и др., 2010) позволили выдвинуть гипотезу о том, что данные ММСК с неким комплексом мутаций присутствуют в нише нормальных ММСК до выделения клеток из ткани, но в условиях давления организма в норме их развитие подавляется присутствием нормального микроокружения. Интересным является также тот факт, что ММСК считаются наиболее вероятными клетками-инициаторами саркомогенеза – процесса, приводящего к развитию опухолей мягких тканей (Xiao W. et al., 2013).

В связи с этим всестороннее изучение спонтанно трансформированных ММСК ЖТ человека внесет вклад в изучение механизмов спонтанной трансформации клеток мезенхимального происхождения в культуре (и, возможно, саркомогенеза), а также безопасности применения ММСК в клинической практике.

Одной из основных характеристик для исследования неопластической трансформации клеток является их генетическая характеристика. Анализ хромосомных aberrаций и профиль экспрессии данных клеток позволят полноценно охарактеризовать процесс спонтанной неопластической трансформации.

Также интересной областью практического применения спонтанно трансформированных ММСК ЖТ является продукция рекомбинантных белков человека. Полученные нами спонтанно трансформированные клеточные линии ММСК ЖТ человека обладают необходимыми характеристиками клеточных линий, применяемых для этих целей. Оценка способности спонтанно трансформированных клеточных линий ММСК ЖТ человека к постоянной генетической модификации даст возможность их использования в качестве нового перспективного источника генетически-модифицированных клеток для нужд биотехнологии и биомедицины.

Цель исследования:

Целью данной работы явилось исследование генетических характеристик спонтанно трансформированных ММСК ЖТ человека.

Задачи исследования:

1. С помощью цитогенетического анализа определить хромосомный набор и aberrации исследуемых трансформированных клеток.
2. Провести сравнительный парный анализ транскриптома образцов спонтанно трансформированных и нормальных ММСК ЖТ человека для определения характерного профиля экспрессии трансформированных клеток.
3. Провести функциональный анализ дифференциально экспрессированных транскриптов для выявления генов и сигнальных путей, затронутых трансформацией.
4. Оценить возможность внесения постоянной генетической модификации в геном спонтанно трансформированных ММСК ЖТ человека с помощью лентивирусной трансдукции.
5. Оценить стабильность трансгенной системы на основе трансформированных ММСК ЖТ человека.

Научная новизна и практическая значимость: в настоящей работе впервые проведен комплексный анализ генетических характеристик нового объекта - спонтанно трансформированных ММСК ЖТ человека. Показаны изменения, произошедшие с клетками в результате трансформации, как на уровне хромосом, так и на уровне транскрипции. Обнаружен высокий уровень структурных хромосомных aberrаций, а также показан характерный профиль экспрессии генов, согласующихся с амплификацией центросом и хромосомной нестабильностью спонтанно трансформированных ММСК ЖТ человека.

Впервые показано, что профиль экспрессии спонтанно трансформированных ММСК ЖТ человека ассоциируется с нарушениями в сигнальных путях АКТ и RHOA, а также RAS (RalA и RalB), ATR/ATM и E2F, что позволило расширить представления о причинах спонтанной трансформации ММСК человека в культуре.

Из 30-ти наиболее значимо изменивших экспрессию транскриптов впервые показана aberrантная экспрессия 6 генов (HSPB6, PLAC9, FEZ1, DTWD1, APH1A, ATP5L), которые ранее не ассоциировали с неопластической трансформацией клеток. Возможно, aberrантная экспрессия этих генов является маркерной для неопластической трансформации ММСК ЖТ человека.

Впервые исследована эффективность лентивирусной трансдукции спонтанно трансформированных ММСК ЖТ человека. Спонтанно трансформированные ММСК ЖТ человека эффективно трансдуцируются лентивирусным вектором и, при селективном отборе клонов, стабильно экспрессируют трансген при длительном пассировании. Получение на основе данных клеток продуцентов рекомбинантных терапевтических белков будет способствовать развитию биотехнологии и биомедицины.

Положения, выносимые на защиту:

1. У спонтанно трансформированных ММСК ЖТ человека наблюдается хромосомная нестабильность.
2. Хромосомная нестабильность и наблюдаемые aberrации появилась вследствие амплификации центросом и последующего мультиполярного митоза.

3. Спонтанная трансформация ММСК ЖТ человека в культуре ассоциируется с нарушениями в сигнальных путях АКТ и RHOA, а также RAS (RalA и RalB), ATR/ATM и E2F.

4. 6 из 30-ти наиболее значимо изменившихся по экспрессии генов (HSPB6, PLAC9, FEZ1, DTWD1, APH1A, ATP5L) ранее не упоминалась в литературе в связи с неопластической трансформацией. Данные гены являются новыми потенциальными маркерами трансформации ММСК ЖТ человека.

5. Спонтанно трансформированные ММСК ЖТ человека эффективно трансдуцируются лентивирусом. После селекции трансдуцированные клетки стабильно экспрессируют трансген и нарабатывают белок в течение 25 пассажей.

Апробация работы: результаты, отражающие основные этапы диссертационной работы представлены в виде устных докладов на ежегодных конференциях молодых ученых ФГБУ «МГНЦ» РАМН в 2011-2013 г.г., а также опубликованы в виде тезисов на IV международном конгрессе «Stem Cells and Tissue Formation». Quantitative stem cell biology – From models to applications» в 2012 г. (Дрезден, Германия), на конкурсной конференции молодых ученых ФГБУ «МГНЦ» РАМН в 2011-2013 г. (г. Москва), на V-ом Ежегодном Международном Симпозиуме «Актуальные вопросы генных и клеточных технологий» в 2012 г. (г. Москва). Проект разработки клеток-продуцентов на основе спонтанно трансформированных ММСК ЖТ человека стал одним из победителей конкурсной конференции У.М.Н.И.К.-2012.

Работа апробирована и рекомендована к защите на заседании научного семинара ФГБУ «МГНЦ» РАМН 4 декабря 2013 года.

Личный вклад автора в проведенные исследования: написание рукописи настоящей работы выполнено автором лично. Автором самостоятельно подобрана и проработана отечественная и зарубежная литература по теме диссертации. Все эксперименты для диссертационного исследования выполнены автором самостоятельно. Автором самостоятельно проведена лабораторная работа по отработке оптимальных протоколов трансдукции клеток лентивирусными частицами, получения качественных цитогенетических препаратов, а также поисково-аналитическая работа по обработке данных транскриптомного анализа. Статистический анализ всех экспериментальных данных, оценка полученных результатов и формулировка выводов в настоящей работе сделаны автором лично. Эксперименты по определению ростовых характеристик культур спонтанно трансформированных ММСК ЖТ на культуральных средах с разным содержанием эмбриональной телячьей сыворотки выполнены совместно с сотрудниками лаборатории генетики стволовых клеток ФГБУ «МГНЦ» РАМН, гибридизация образцов тотальной РНК на микрочипе Illumina проводилась в компании «Геноаналитика».

Публикации: по материалам диссертации опубликовано 8 печатных работ. Из них 3 статьи опубликованы в рецензируемых научных журналах, рекомендуемых ВАК МОН РФ.

Структура и объем работы: диссертация состоит из разделов: оглавление, введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, заключение, выводы, список сокращений, список цитируемой литературы и два приложения. Список литературы состоит из 330 источников, из них 9 отечественных и 321 зарубежных авторов. Работа изложена на 124 листах машинописи (без учета списка литературы и приложений). Текст содержит 20 рисунков и 11 таблиц.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Используемые в работе культуры клеток

Все культуры спонтанно трансформированных и нормальных ММСК ЖТ человека были ранее получены по оригинальному протоколу (Ржанинова А.А. и др., 2010) и депонированы в криобанк лаборатории генетики стволовых клеток ФГБУ «МГНЦ» РАМН. Клетки выделяли из липоасpirата 6-ти здоровых доноров разного пола (2 мужчин обозначены как – BL29, KR30 и 4 женщин обозначены как - VA18, VO21, PU28, BB25) и возраста (39±13,97 лет). Также от четырех первичных культур клеток - VA18, PU28, KR30, BL29, - с помощью метода культивирования клеток в низкой плотности выделяли по пять моноклональных культур спонтанно трансформированных ММСК, обозначенных с помощью добавочного индекса $_1$, $_2$, $_3$, $_4$, $_5$ к названию исходной культуры.

Рутинное культивирование клеток

Клетки нормальных и спонтанно трансформированных ММСК культивировали в стандартной культуральной среде: DMEM, 10% телячьей эмбриональной сыворотки крови сыворотки (ЭТС), 4 mM L-глутамина, 10 нг/мл рекомбинантного основного фактора роста фибробластов (ФРФ-2), 8 МЕ/мл гепарина-натрия, амикацина 100 мг/л при стандартных условиях - в CO₂ инкубаторе при температуре 37°C, атмосфере 5% CO₂ и 98% влажности. Культуры пассировали по достижении 80-90% конfluenceности, кратность посева 1:4. Снимали клетки с подложки с помощью дезагрегирующего раствора трипсина-ЭДТА. Концентрацию клеток определяли с помощью камеры Горяева и формулы $N \times 1,25 \times 10^4$, где N – среднее арифметическое число клеток в 20-ти неразграфленных квадратах по двум диагоналям камеры Горяева. Культуру клеток трансформированных ММСК VA18 $_2$ в экспериментах по трансдукции и моноклональные культуры VA2GFP $_1$ k, VA2GFP $_2$ k, VA2GFP $_3$ k, VA2GFP $_4$ k в экспериментах по определению копийности и продуктивности трансгена растили на базовой ростовой среде (среда DMEM, 5% ЭТС, 4 mM L-глутамин, амикацин 100 мг/л.)

Трансдукцию клеток лентивирусным вектором проводили в поддерживающей ростовой среде (среда DMEM, 1% ЭТС, 4 mM L-глутамин, амикацин 100 мг/л).

Приготовление препаратов рутинно окрашенных метафазных пластинок

Для приготовления препаратов использовали культуры спонтанно трансформированных ММСК ЖТ (BL29, KR30, VA18, VO21, PU28, BB25) и полученные из них моноклональные культуры (VA18 $_1,2...5$; PU28 $_1,2...5$; KR30 $_1,2...5$; BL29 $_1,2...5$) не старше 14 пассажа после выделения. Приготовление осуществляли по оптимизированному протоколу спонтанно трансформированных ММСК ЖТ (Омельченко Д.О. и др., 2012).

Исследование рутинно окрашенных метафазных пластинок

Исследование окрашенных метафазных пластинок проводили с помощью световой микроскопии при малом (X100) и большом (X1000) увеличении с использованием иммерсионного масла. В каждой метафазной пластинке проводили подсчет числа хромосом, а также определяли наличие различных хромосомных aberrаций. Всего для каждой культуры клеток проанализировано 30-50 метафазных пластинок.

Статистический анализ проводили с помощью программы Statistica 8 («StatSoft», США). Различия считались значимыми при $p\text{-value} < 0,05$.

Выделение тотальной РНК из образцов клеточных культур и гибридизация кРНК на микрочипе Illumina HumanHT-12 v4 Expression BeadChip

Процедуру выделения тотальной РНК проводили с помощью TRIzol reagent (Ambion, США) согласно протоколу производителя (http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/trizol_reagent.pdf)

Подготовку образцов тотальной РНК каждой из 12-ти спонтанно трансформированных и нормальных ММСК ЖТ и гибридизацию с зондами на микрочипе проводили согласно протоколу производителя (http://supportres.illumina.com/documents/myillumina/3466bf71-78bd-4842-8bfc-393a45d11874/wggex_direct_hybridization_assay_guide_11322355_a.pdf) на базе лаборатории ЗАО “Геноаналитика”.

Обработка первичных данных интенсивности флуоресценции зондов, полученных после детекции микрочипа Illumina HumanHT-12 v4 Expression BeadChip

Первичные данные по флуоресценции обрабатывали с помощью пакета lumi Bioconductor и статистического языка программирования R, специально разработанного для обработки данных Illumina. Преобразования данных для выявления области достоверного сигнала проводили с помощью метода VST (variance-stabilizing transformation) и алгоритма RSN (Robust Spline Normalization) (Du P. et al., 2008).

Фильтрацию данных проводили с помощью программы статистического языка программирования R 3.0.2 (McClintick J.N. & Edenberg H.J., 2006) по пороговому уровню детекции сигнала $\text{detection } p\text{-value} < 0,01$ в 50% образцов хотя бы в одной из двух групп (т.е. в трансформированных или в нормальных клетках).

Определение дифференциально экспрессированных транскриптов

Дифференциально экспрессированные транскрипты между спонтанно трансформированными и нормальными ММСК ЖТ определяли с помощью обработки преобразованных данных микрочипа для парных образцов программой Significance analysis of microarrays (SAM) 4.0 MS Excel add-in (<http://statweb.stanford.edu/~tibs/SAM/sam.pdf>) при пороговой значимости $\Delta = 2,09$ ($\text{FDR} = 1,03\%$ при данном значении Δ), $\text{FDR } q\text{-value} < 0,05$ и $\text{FDR } q\text{-value} < 0,01$.

Анализ дифференциально экспрессированных транскриптов

Функциональный анализ на уровне отдельных транскриптов проводили вручную с использованием информационных сервисов NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>).

Функциональный анализ на уровне генов проводили с помощью интернет-сервиса GOrilla (Eden E. et al., 2009) (анализ представленности генов по биологическим процессам в базе данных GeneOntology (GO)) для чего список дифференциально экспрессированных транскриптов, полученный по алгоритму SAM ($q\text{-value} < 0,01$ и $0,5 \geq \text{FC} \geq 2$), загружали на сайт программы и анализировали с порогом значимости результатов $\text{FDR } q\text{-value} < 0,01$.

Групповой функциональный анализ ранжированного списка генов без порога Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) (Subramanian A. et al., 2005) проводили по базе данных MSigDB (канонические сигнальные пути, химические и генетические пертурбации, онко-сигналы) с порогом значимости результатов обчета $\text{FDR } q\text{-value} < 0,05$.

Отбор культуры клеток трансформированных ММСК ЖТ, способной к росту на бессывороточной среде

Для процедуры отбора брали культуры трансформированных ММСК ЖТ человека: BL29, KR30, VA18, VO21, PU28, BB25 и полученные из них моноклональные культуры. Клетки культур рассеивали по 50 тыс. клеток на маленький флакон (25 см²) в минимальной

ростовой среде (DMEM с добавлением 4 мМ L-глутамина, 100 мг/л амикацина) со сниженными концентрациями ЭТС – 5%, 1%, 0,1%, и 0% (при этом ЭТС заменяли 0,1% желатином). В качестве контроля использовали клеточную линию A204. Срок культивирования клеток тестируемых культур составлял 20 дней.

Лентивирусная трансдукция культуры клеток VA18_2 спонтанно трансформированных ММСК ЖТ человека

Культуру неопластических клеток VA18_2 для отработки условий трансдукции культивировали в базовой ростовой среде. Культуру трансдуцировали лентивирусными частицами с геном зеленого флуоресцентного белка TagGFP2 (титр $5 \cdot 10^5$ Т.Е./мл) при множественности инфекции (MOI) равной 5, 10, 20, 40 и 50 в поддерживающей среде. Затем пассировали клетки как обычно в базовой ростовой среде в течение 25 пассажей.

Селекция флуоресцентных клеток трансдуцированной культуры VA18_2 спонтанно трансформированных ММСК ЖТ человека

Для отбора стабильных флуоресцентных клонов клетки культуры VA18_2 после трансдукции рассеивали в предельном разведении в 96-луночных плашках для получения отдельных флуоресцентных клонов. Впоследствии при наблюдении фазово-контрастной и флуоресцентной микроскопией из лунок выделяли 4 моноклональных культуры флуоресцентных клеток, обладающих наиболее высокими пролиферативными характеристиками и интенсивностью флуоресценции по результатам наблюдений. Найденные колонии переносили на отдельные культуральные флаконы под номерами 1, 2, 3 и 4. Данные культуры культивировали и исследовали в течение 25 пассажей (~6 месяцев).

Проточная цитометрия клеток трансдуцированной культуры VA18_2 спонтанно трансформированных ММСК ЖТ человека:

Эффективность трансдукции и интенсивность флуоресценции клеток культуры VA18_2 спонтанно трансформированных ММСК ЖТ человека при длительном культивировании анализировали с помощью цитометрии на проточном цитофлуориметре CyFlow® Space (Partec, Германия). Полученные данные обрабатывали в программе FCS Express 4 Flow Cytometry - RUO (De Novo Software, США).

Выделение ДНК из клеток трансдуцированной культуры VA18_2 спонтанно трансформированных ММСК ЖТ человека

Выделение ДНК из спонтанно трансформированных ММСК ЖТ человека проводили набором «К-сорб-100» (СИНТОЛ, Россия) согласно протоколу производителя. Полученные растворы ДНК хранили в морозилке при температуре -20°C. Концентрацию выделенной ДНК определяли флуоресцентным методом с помощью набора Qubit™ dsDNA HS assay kit (Invitrogen, США) согласно протоколу производителя.

Измерение копииности трансгена в клетках трансдуцированной культуры VA18_2 спонтанно трансформированных ММСК ЖТ человека

Для определения количества интегрированных в геном одной клетки копий трансгена использовали метод количественной ПЦР в реальном времени, описанный в статье (Joshi M.U. et al., 2008). Для этого абсолютное количество копий трансгена на клетку устанавливали по линейной аппроксимации десятикратных разведений лентивирусной плазмиды pLVT-TagGFP2-N в каждом эксперименте. Для ее построения использовали серию разведений плазмиды pLVT-TagGFP2-N (таблица 1) в 10 нг/мкл ДНК нетрансфицированных клеток в качестве ДНК-носителя.

Таблица 1. Разведения плазмиды с учетом ее молекулярной массы

Масса плазмиды на реакцию	Число копий	Log ₁₀ Копий
15 нг	2000000	6,301
1,5 нг	200000	5,301
150 фг	20000	4,301
15 фг	2000	3,301
1,5 фг	200	2,301

Массу одной копии плазмиды рассчитывали по формуле $m=M/N_A$, где M - молекулярная масса лентивирусной плазмиды ($M=4,45 \times 10^6$ Да), а N_A - число Авагадро ($N_A=6,02 \times 10^{23}$ копий (или молекул)/моль). Таким образом, вес одной копии плазмиды равен 7,39 аг, т.е. 1 нг pLVT-TagGFP2-N содержит $\approx 1,35 \times 10^8$ копий TagGFP2. По полученному соотношению $\text{Log}_{10}(\text{число копий})/C_t$ определяли число копий TagGFP2 в исследуемых образцах ДНК трансфицированных клеток.

Эксперименты ПЦР в реальном времени проводили на амплификаторе CFX96 (Bio-Rad, США). Для ПЦР реакции использовали реагенты SmarTaq ДНК-полимеразу и соответствующий ей буфер (166 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 670 mM Tris-HCL (pH 8.8 at 25°C); 0,1% Tween-20) (Диалат Лтд., Россия). Состав ПЦР реакции приведен в таблице 2.

Таблица 2. Состав ПЦР реакции

Реактивы	на 25 мкл реакции (мкл)
10x Ampli буфер	2,5
MgCl ₂ 2,5 М	2
Lenti-F+R 10мкМ каждого	2
TaqMan-зонд 10мкМ	1
dNTP 200 мкмоль каждого	2
SmarTaq 5 ед./мкл	1
H ₂ O	12,5
ДНК (или ДНК+pLVT) 5 нг/мкл	2

Праймеры и зонды предоставлялись фирмой «ДНК-синтез», Россия. Использованные праймеры универсальны и подходят для всех лентивекторов на основе ВИЧ-1 (5'-конец GAG, продукт 85 п.о.) (таблица 3). Все измерения проводили в минимум трех повторностях.

Таблица 3. Последовательность праймеров и TaqMan-зонда

Название	Последовательность 5'->3'	t°C отжига
Lenti-F	GGAGCTAGAACGATTCGCAGTTA	61,9
Lenti-R	GGTTGTAGCTGTCCCAGTATTTGTC	62,5
Lenti-probe	VIC-ACAGCCTTCTGATGTTTCTAACAGGCCAGG-BHQ1	72,6

Анализ данных проводили с помощью программного обеспечения Bio-Rad CFX Manager 3.0 (Bio-Rad, США). Данные рассчитывались с 4-го цикла, чтобы убрать первичные помехи, расчет C_t проводился по единому пороговому значению, автоматически рассчитываемому программой.

Параметры ПЦР реакции использовали следующие: Первичная денатурация – 95°C, 5 мин; Денатурация – 95°C, 15 с; Отжиг праймеров и элонгация – 60°C, 1 мин; Снятие показаний флуоресценции проб. Этапы 2-4 – 45 циклов.

Выделение белка TagGFP2 из клеток трансдуцированной культуры VA18_2 спонтанно трансформированных ММСК ЖТ человека

Белок выделяли с помощью GFP quantitation kit (Biovision, США) из 10^6 клеток. Все манипуляции проводили в соответствии с протоколом производителей (<http://www.biovision.com/manuals/K815.pdf>). Образцы белка (лизаты клеток) хранили в буфере GFP assay buffer (Biovision, США) при -20°C .

Измерение концентрации белка TagGFP2 в лизатах клеток трансдуцированной культуры VA18_2 спонтанно трансформированных ММСК ЖТ человека

Измерение интенсивности флуоресценции разведений стандарта и лизатов образцов с TagGFP2 проводили на флуоресцентном планшетном ридере The Wallac 1420 VICTOR2 (PerkinElmer, США) по предустановленному протоколу для измерения флуоресцентных образцов Fluorescein (Ex/Em = 485nm/535nm).. По калибровочной кривой флуоресценции стандарта GFP определяли концентрацию белка в опытных образцах. Измеренное количество белка выражали в нг на 10^6 клеток и строили зависимость интенсивности флуоресценции от количества белка в лизате от сроков пассирования.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Хромосомный набор и хромосомные aberrации в клетках культур спонтанно трансформированных ММСК ЖТ человека

Цитогенетическое исследование провели на 26 культурах спонтанно трансформированных ММСК ЖТ человека. Из них шесть первичных культур спонтанно трансформированных ММСК ЖТ – VA18, PU28, KR30, BL29, BB25 – выделены из культур нормальных ММСК ЖТ шести разных доноров. Также в анализ брали моноклональные культуры трансформированных клеток, выделенных из культур VA18, PU28 (получены от двух женщин) и культур KR30, BL29 (получены от двух мужчин). В каждой культуре спонтанно трансформированных клеток – первичных и моноклональных, – исследовано от 30 до 50 метафазных пластинок.

Модальное число хромосом на клетку, как в первичных культурах, так и в моноклональных культурах спонтанно трансформированных ММСК ЖТ человека, попадало в диапазон между триплоидным (69 хромосом на клетку) и тетраплоидным (92 хромосомы на клетку) хромосомным набором. При этом встречались клетки со значительным отличием по хромосомному набору от модального значения своей же культуры, у которых наблюдаемое число хромосом на клетку варьировало в пределах от 59 до 175 (рисунок 1). В клетках наблюдалась анеуплоидия.

Для сравнения хромосомного набора культур применяли непараметрический дисперсионный анализ. Культуры сравнивали по хромосомному набору с помощью теста Краскела–Уоллиса. Результаты статистического анализа показали, что хромосомный набор первичных культур спонтанно трансформированных ММСК ЖТ, полученных от разных доноров статистически значимо различается ($p=0,000$). Коэффициент вариации хромосомного набора в большинстве случаев не превышает 10%, а относительная ошибка среднего значения не превышает 5%, что говорит об однородности хромосомного набора внутри культуры спонтанно трансформированных ММСК ЖТ.

Исходные культуры трансформированных ММСК ЖТ человека - VA18, PU28, KR30, BL29- и полученные из них моноклональные культуры различны между собой по хромосомному набору ($p=0,000$), что подтверждает предположение о наличии хромосомной нестабильности. Наиболее стабильный хромосомный набор показали культуры PU28, кото-

рые отличались наименьшим разбросом и близким значением медианы числа хромосом между исходной культурой и моноклональными культурами (Kruskal-Wallis test: $H(5, N=300)=2,531, p=0,772$).

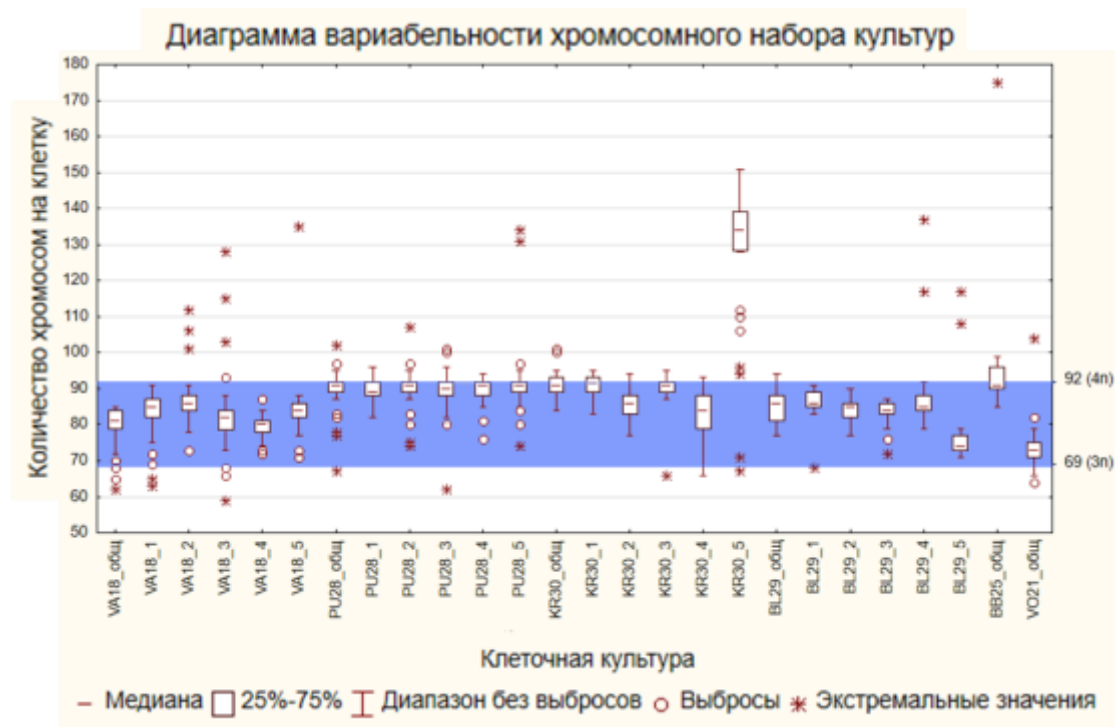


Рисунок 1. Диаграмма вариабельности хромосомного набора культур спонтанно трансформированных ММСК ЖТ человека. N_общ – культура, полученная из клеток ММСК ЖТ донора N; N_1,2,3,4,5. – моноклональные культуры, полученные из культуры N. Выбросами обозначены значения количества хромосом на клетку на расстоянии более $1,5x(25\%-75\%)$ от медианы, а экстремальные значения на расстоянии более $3x(25\%-75\%)$. Синим цветом отмечена зона между триплоидным и тетраплоидным числом хромосом.

Во всех 26 проанализированных культурах спонтанно трансформированных ММСК ЖТ наблюдалось множество хромосомных и хроматидных aberrаций. Из всех хромосомных аномалий 46,41% составляли полицентрики (дицентрики, трицентрики и т.д.), 30,94% двойные микрохромосомы, 3,38% кольцевые хромосомы, 18,77% другие хромосомные aberrации (одно- и дву-хроматидные разрывы, межхромосомные хроматидные обмены и др.). В среднем в каждой культуре наблюдается 47,4% клеток, несущих aberrантные хромосомы (таблица 4).

Учитывая, что в нормальной культуре ММСК процент клеток с хромосомными aberrациями может составлять ~4% (Tarte K. et al., 2010), а у исследованных культур процент aberrантных клеток в среднем составлял 47,4% по всем культурам (от 11,4 % до 86,7%), данные клетки можно охарактеризовать как трансформированные с активно протекающими мутационными процессами.

Наиболее часто встречающиеся хромосомные аномалии в популяциях трансформированных ММСК ЖТ – дицентрики и двойные микрохромосомы. Согласно данным литературы, накопление подобных хромосомных aberrаций характерно для неопластических клеток, в которых протекает цикл из разрыва хромосомы, слияния и создания перемычки («breakage-fusion-bridge», цикл ВФБ), который является основной причиной сильного генетического разнообразия клеток во многих видах неоплазий (Murnane J.P., 2012). Нарушения нормальной структуры хромосом и повышенный уровень рекомбинации в опухолевых клетках приводит к образованию данных типов aberrаций (Colnaghi R. et al., 2011; Gascoigne K.E. & Cheeseman I.M., 2013).

Таблица 4. Статистика хромосомных aberrаций исходных популяций спонтанно трансформированных ММСК ЖТ человека и их моноклональных культур.

Популяция	Метафаз исследовано	Полицентрики	Двойные микрохромосомы	Кольца	Другие хромосомные aberrации	Всего aberrаций	Число aberrантных метафаз	% aberrантных клеток
VA18_общ	50	4	0	0	5	9	6	12,0
VA18_1	35	6	1	0	1	8	7	20,0
VA18_2	35	12	2	2	11	27	19	54,3
VA18_3	35	9	0	0	7	16	13	37,1
VA18_4	35	8	3	3	3	17	13	37,1
VA18_5	35	2	1	0	2	5	4	11,4
PU28_общ	85	17	9	0	2	28	17	20,0
PU28_1	50	3	9	0	1	13	10	20,0
PU28_2	35	1	3	0	3	7	6	17,1
PU28_3	35	10	0	0	1	11	10	28,6
PU28_4	35	9	11	0	1	21	15	42,9
PU28_5	35	3	14	1	8	26	15	42,9
KR30_общ	50	17	18	0	3	40	21	42,0
KR30_1	30	14	18	1	5	38	16	53,3
KR30_2	30	5	10	0	3	18	24	80,0
KR30_3	30	18	15	1	10	44	16	53,3
KR30_4	30	16	4	0	2	22	16	52,9
KR30_5	30	16	21	1	6	44	19	63,3
BL29_общ	30	14	25	5	1	45	16	53,3
BL29_1	30	25	33	4	8	70	26	86,7
BL29_2	30	20	18	2	5	44	24	80,0
BL29_3	30	52	14	6	10	82	22	73,3
BL29_4	30	39	11	1	7	58	23	77,8
BL29_5	30	11	7	4	2	24	18	58,8
BB25_общ	30	32	9	4	9	54	23	76,5
VO21_общ	50	15	7	0	6	28	19	38,0

Парный анализ транскриптома нормальных и трансформированных ММСК ЖТ человека

Для исследования использовали культуры нормальных ММСК, выделенные из липоаспирата 6-ти здоровых доноров (обозначенные BL29-N, KR30-N, VA18-N, VO21-N, PU28-N и BB25-N), и образцы клеточных культур спонтанно трансформированных ММСК, полученные из культур нормальных ММСК ЖТ тех же доноров (обозначенные BL29-T, KR30-T, VA18-T, VO21-T, PU28-T и BB25-T). Первичные данные по гибридизации тотальной РНК на микрочипе Illumina HT-12 v4 в виде таблицы содержали сигналы от 47318 транскриптов по каждому из 12 образцов.

Полученные профили экспрессии генов исследовали методом анализа соответствий в программе J-Express Pro 2012. Обнаружено, что образцы нормальных клеток значительно отличаются друг от друга по профилю экспрессии генов, в то время как образцы трансформированных клеток сгруппированы близко друг к другу и, следовательно, очень близки по профилю экспрессии (рисунок 2).

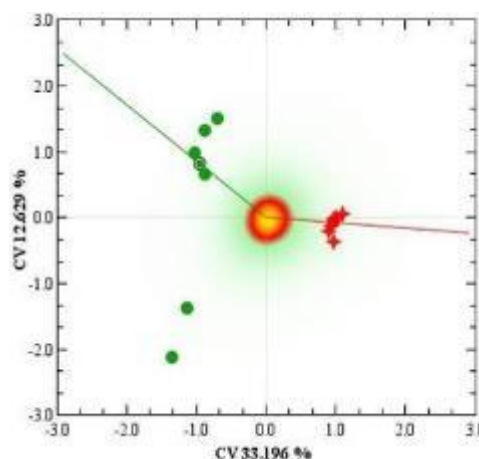
Рисунок 2. Анализ соответствия профилей экспрессии генов нормальных (●) и трансформированных (◆) образцов.

Линии векторов показывают средний профиль экспрессии по каждой группе образцов.

Кумулятивный процент инерции равен 45.9%.

CV – коэффициент вариации

Получено с помощью программы J-Express Pro 2012.



Функциональный анализ наиболее значимо изменившихся по экспрессии транскриптов

После первичной обработки данных микрочипа по всем 12 образцам из 47318 зондов получили 14246 транскриптов. Далее программой Significance analysis of microarrays (SAM) список транскриптов ранжировали по значимости и стабильности количественного изменения не только между парами исследуемых образцов трансформированных ММСК, полученных из одного донора, но и во всей совокупности 6-ти исследуемых образцов. Самый высокий ранг в списке соответствовал наиболее значимым и самым высоким количественным изменениям транскрипции по всем образцам между группами трансформированных и нормальных клеток.

Из верхней части ранжированного списка транскриптов по порядку выделяли гены с самым высоким рангом и значимым изменением уровня экспрессии по результатам анализа SAM. В данную группу вошли 30 наиболее значимо измененных транскриптов по всей совокупности 6-ти исследуемых образцов трансформированных клеток по сравнению с 6-ю образцами нормальных ММСК. При анализе функциональных характеристик этой группы транскриптов по базе данных NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>) обнаружили, что выявленный профиль изменений экспрессии генов в опытных образцах является признаком неопластической трансформации. Показано, что 6 генов из этого списка (HSPB6, PLAC9, FEZ1, DTWD1, APH1A, ATP5L) ранее не описывались в качестве генов, экспрессия которых связана с трансформацией клеток и онкологией (таблица 5).

Изменения транскрипции по этим генам высоко достоверны и характерны для всех 6-ти линий трансформированных ММСК, что дает основание охарактеризовать культуры спонтанно трансформированных ММСК ЖТ человека как неопластические.

Таблица 5. Транскрипты с наиболее значимым количественным изменением согласно SAM

Пониженная экспрессия				Повышенная экспрессия			
Ген	Ранг	(FC)	Описание	Ген	Ранг	(FC)	Описание
HTRA1	-44,66	0,04	Активирует эпителиально-мезенхимную транзицию (EMT) и ATM/ATR, способствует росту и инвазивности опухолей	PRAME	42,55	3,90	Гиперэкспрессия в клетках меланомы, некоторых видах сарком мягких тканей
HSPB6	-38,7	0,08	Защита клеток от окислительного стресса с усилением АКТ сигнального пути, ингибирование F-актина через RhoA ГТФ-азу	FOXR1	31,57	3,72	Эмбриональный маркер, гиперэкспрессия в клетках нейробластомы, клеточных линиях остеосаркомы HOS
PLAC9	-33,58	0,19	Малоизученный плацентоспецифичный ген	TUBB2B	31,11	27,22	Экспрессия тубулинов в нормальных и опухолевых тканях варьируется
CTSL (NM_145918)	-33,25	0,05	Стабилизация экспрессии p53BP1, генетическая нестабильность, нарушения пролиферации клеток	APH1A	24,14	3,45	Белки изоформы гамма-секретазы, повышены в раковых клетках
CTSL (NM_001912)	-32,95	0,04		GMPS	23,94	1,83	Онкомаркер пролиферации неопластических клеток
PRRX1	-30,81	0,10	Индукция мезенхимно-эпителиального перехода, метастазирование	GART	23,92	2,40	Маркер недифференцированных клеток, связан с активной пролиферацией и синтезом ДНК и РНК
ADAMTSL1	-29,66	0,70	Семейство белков-металлопротеаз, регуляции EMT, организация внеклеточного матрикса	PTPN2	23,84	1,42	Регуляция роста, дифференцировки и митотического цикла в трансформированных клетках через негативную регуляцию АКТ пути

IL13RA2	-29,63	0,07	Онкомаркер злокачественных неоплазий	PPP3R1	22,87	1,64	Субъединица Ca ²⁺ кальмодулин-стимулируемой фосфатазы. Гиперэкспрессия в активно мигрирующих, обладающих метастатическим потенциалом клетках
PPAP2B	-29,39	0,05	Регуляция процессов эндотелиальной клеточной миграции и клеточной адгезии (PTEN - бета-катенин/LEF-1)	LAPTM4B	21,10	3,65	Гиперэкспрессия в карциномах разного типа
DCN	-29,18	0,02	Биомаркер агрессивности опухолей мягких тканей, злокачественная трансформация клеток	NET1	20,68	2,51	Активация сигнального пути RHOA и АКТ. Гиперэкспрессия в мигрирующих опухолевых клетках
FEZ1	-28,72	0,72	Формирование и элонгация аксонов, движение	EEF1A2	20,25	16,79	Гиперэкспрессия во многих видах карцином
ENG	-28,32	0,25	Кодирует ко-рецептор TGFβ, экспрессия снижена при карциноме молочной железы	CGN	20,06	1,45	Регуляция активности RHOA и АКТ сигнального пути. Активация мезенхимно-эпителиального перехода
SH3BGRL3	-27,96	0,25	Усиление экспрессии онкогена REL, гиперэкспрессия белков семейства Rel/NF-κB	HSP90AB1	19,97	2,67	Маркер недифференцированных клеток, экспрессируется в клетках эпителиального рака и фибросарком
KLF12	-27,6	0,80	Транскрипционный репрессор, регулирует адгезию, миграцию, и апоптоз раковых клеток	CDC42SE1	19,34	1,95	Ингибирование Cdc42-активации JNK сигнала
DTWD1	-25,88	0,70	Малоизученный ген, потенциальный маркер трансформации	ATP5L	19,29	3,34	Субъединица митохондриальной АТФ синтазы

Примечание: FC – Кратность изменения экспрессии

Связь дифференциальной экспрессии транскриптов с результатами цитогенетического анализа

По результатам цитогенетического анализа сделали вывод о наличии хромосомной нестабильности в клетках культур спонтанно трансформированных ММСК ЖТ человека. Для того, чтобы подтвердить это на уровне транскрипции проанализировали профиль экспрессии 70 генов - 70CIN (Carter S.L. et al., 2006), изменение экспрессии которых высоко коррелирует с наличием хромосомной нестабильности в клетках. В результате анализа обнаружено, что 64 из 70 генов значимо повысили экспрессию в спонтанно трансформированных ММСК ЖТ человека по сравнению с нормальными при уровне значимости $q\text{-value} < 0,05$. В списке присутствуют 29 генов, aberrантная экспрессия которых функционально связана с анеупloidией и хромосомной нестабильностью согласно опубликованным исследованиям. Экспрессия перечисленных ниже генов значимо повышена, при этом 9 из них повысили экспрессию более чем в 2 раза (рисунок 3).

Гиперэкспрессия этих генов связана с нарушениями в морфологии веретена деления, в фокусировке (-) концов микротрубочек на полюсах веретена деления, биполярности веретена деления, поддержке цельности центросом и целостности хромосом, и ассоциируется с амплификацией центросом и тетраплоидизацией клеток (Meraldi P. et al., 2002), а также наблюдаемой анеупloidией клеток.

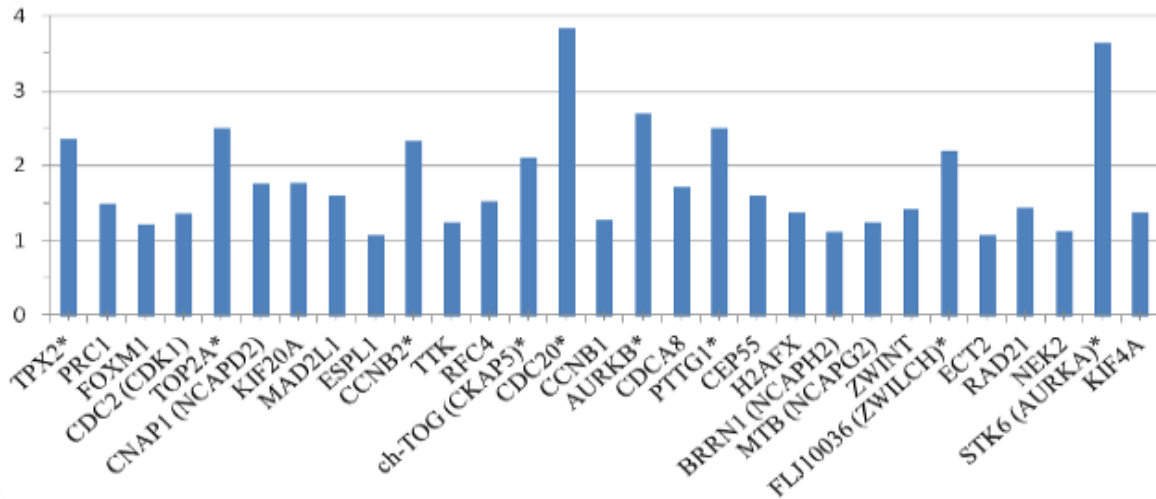


Рисунок 3. 29 генов, ассоциация которых с хромосомной нестабильностью достоверно показана по данным литературы. Кратность изменения их экспрессии (FC) между трансформированными и нормальными ММСК ЖТ человека при $q < 0,05$ отложена по оси абсцисс. Символом * обозначены гены, изменение экспрессии которых было более чем в 2 раза.

Таким образом, амплификация centrosom с последующим мультиполярным митозом является наиболее вероятным механизмом, приводящим к хромосомной нестабильности, анеуплоидии и наблюдаемому хромосомному набору, близкому к тетраплоидному, спонтанно трансформированных ММСК ЖТ человека.

Групповой функциональный анализ дифференциальной экспрессии генов

Для функционального анализа групп дифференциально экспрессированных генов общий список из 14246-ти транскриптов с помощью базы символьных обозначений генов HGNC был сведен до списка из 12977 уникальных символов генов, отражающий профиль экспрессии трансформированных ММСК ЖТ человека. Функциональный анализ по группам генов с порогом по значимости и кратности изменения экспрессии $FDR \text{ } q\text{-value} < 0,01$ и $0,5 \geq FC \geq 2$ провели с помощью программы Gorilla по базе данных Gene Ontology (GO). Анализ показал, что при таком пороге гены с повышенной экспрессией принадлежат по своей молекулярной функции к структурным компонентам рибосом (рибосомным белкам) и РНК-связывающимся белкам, а по клеточным компонентам – к рибонуклеопротеиновым комплексам и макромолекулярным комплексам. Гены с пониженной экспрессией принадлежат к генам структурных элементов внеклеточного матрикса и коллагенам. Они связаны с передачей сигналов в клетках от микроокружения и различными соединениями компонентов внеклеточного матрикса (гликозаминогликаны, серосодержащими, гепарином и др.)

Список из 12977 ранжированных уникальных символов генов без введения порога по значимости или кратности изменения экспрессии анализировали в GSEA (Gene set enrichment analysis) по разным разделам базы данных MSigDB.

Анализ в базе данных канонических сигнальных путей MSigDB показал, что гены, экспрессия которых значимо увеличена (при $FDR \text{ } q\text{-value} < 0,05$) в трансформированных ММСК ЖТ человека, задействованы в процессах транскрипции/трансляции, регуляции клеточного цикла и митотического деления, а также синтезе и репарации ДНК (рисунок 4). Это согласовывалось с данными по дифференциальному анализу отдельных транскриптов (см выше) и подтвердило результаты цитогенетического анализа.

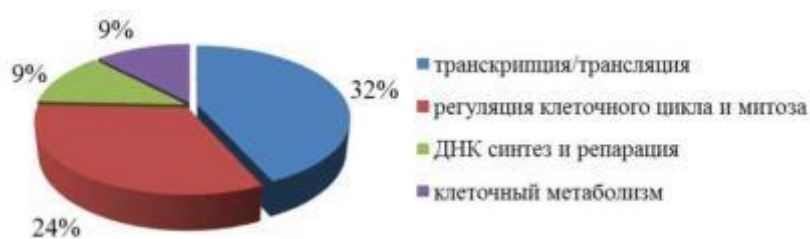


Рисунок 4. Диаграмма значимых совпадений ($q < 0,05$) в процентном соотношении по генам с повышенной экспрессией в базе данных канонических сигнальных путей MSigDB.

Также показано, что гены, экспрессия которых значимо снижена в трансформированных ММСК ЖТ человека, задействованы в процессах межклеточного взаимодействия, передачи сигналов в цитоплазму через поверхностное связывание, реорганизации цитоскелета (рисунок 5). Снижение экспрессии генов цитоскелета, адгезии и внеклеточного матрикса связано с изменением морфологии клеток в процессе трансформации и приобретением ими новых ростовых характеристик, таких как отсутствие контактного ингибирования и способность расти в полужидких средах.

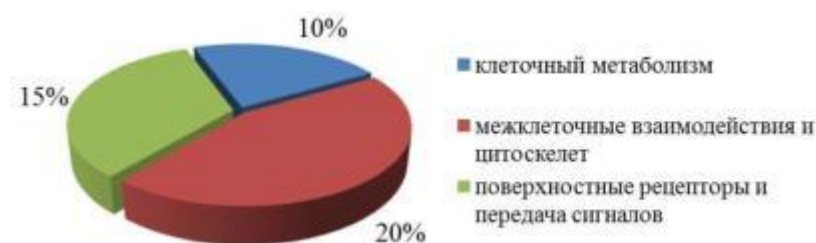


Рисунок 5. Диаграмма значимых совпадений ($q < 0,05$) в процентном соотношении по генам с пониженной экспрессией в базе данных канонических сигнальных путей MSigDB.

Дальнейший анализ проводили по наиболее крупной базе данных MSigDB – базе данных химических и генетических пертурбаций. Результаты этого анализа представлены ниже. При анализе внимание обращалось не только на уровень значимости совпадения, но и на направление изменения экспрессии генов в найденном совпадении. Также учитывали гены, внесшие наибольший вклад в статистику («leading edge») и на сопровождающее описание эксперимента в базе данных. Далее приведен результат комплексного обобщающего анализа результатов GSEA по химическим и генетическим пертурбациям, онкосигналам (таблица 6).

В опытных образцах спонтанно трансформированных ММСК ЖТ человека обнаруженный профиль дифференциальной экспрессии генов характеризовал неопластическую трансформацию клеток. Наблюдалась высокая представленность генов, связанных с нарушениями в процессах репликации, репарации ДНК и структуре хроматина, профиль экспрессии которых совпадает с наблюдаемыми профилями экспрессии многих раковых клеток.

Результаты свидетельствовали также о том, что иммортализация и трансформация ММСК связаны с нарушениями в сигнальных путях АКТ и RHOA, также наблюдается связь с RAS (RalA и RalB), ATR/ATM и E2F путями.

Таблица 6. Результаты группового функционального анализа GSEA (сигналы трансформации и онкосигналы)

<i>Повышенная экспрессия генов</i>	<i>Пониженная экспрессия генов</i>
Запуск сигнального каскада киназы ATR в ответ на репликативный стресс (Smith J. et al., 2010)	Поддержка и структурное ремоделирование хроматина
Отсутствие копирования хромосом, aberrантное вхождение в митоз, хромосомная нестабильность (Chang S., 2012)	Гены, сниженная экспрессия которых относится к кластеру иммортализации (Fridman A.L. & Tainsky M.A., 2008)
Активация пре-репликативного комплекса, репликация и элонгацию цепи ДНК, G2-M переход (часть сигнального пути ATR/ATM), репарация ДНК	Гены-маркеры альвеолярной рабдомиосаркомы (Ren Y.X. et al., 2008)

Активация и контроль транскрипции TERT. Процессинг и сплайсинг мРНК	Кластер генов-маркеров рака молочной железы
Транскрипционная регуляция пролиферации - семейство E2F (Müller H. & Helin K., 2000). E2F3a, E2F2 и TFDP1 (в 1,47, 1,44 и 1,58 раз соответственно)	Гены, снижение которых связано с трансформацией клеток через RHOA (Berenjeno I.M. et al., 2007) и KRAS (Chiaradonna F. et al., 2006), а также с онкогеном АКТ1
Гены, регулируемые с-МЫС, экспрессия которого снижена в 4,8 раз (Zeller K.I. et al., 2003; Kaur M. & Cole M.D., 2013; Okuyama H. et al., 2010)	Падение экспрессии генов молекул клеточной адгезии, ЕСМ-рецепторов, интегринов и синдеканов, генов внеклеточного матрикса
Модификация гистонов и структуры хроматина – увеличение продолжительности жизни клеток, повышенное метилирование онкосупрессоров (комплекс HCF1, цели и партнеры EZH2)	Сниженной экспрессии NFκB-индуцируемым генам матрикса, адгезии и цитоскелета
Гиперэкспрессия кластера генов пролиферации карциномы шеи (Ishida S. et al., 2001), коррелирующего с трансформацией клеток по TP53 и RB (retinoblastoma)	Сниженная экспрессия связанных с EMT генов, характерная для инвазивных типов рака (Anastassiou D. et al., 2011)
Подвижность клеток и метастазирование меланомы и остеосаркомы. Гены NME1, NME2, связанные с процессингом и сплайсингом мРНК, их гиперэкспрессия вызвала повышение ACIN1, PABP, HNRPA2B1, BOP1 и GEMIN (Lee J.H. et al., 2008)	Сниженная экспрессия генов, связанных с мутациями в ММСК-предшественниках саркомы Юинга (Riggi N. et al., 2008)
Анеуплоидия и эпителиально-мезенхимный переход (EMT) - YBX1 (Lasham A. et al., 2013) и ZNF217 (Thollet A. et al., 2010; Vendrell J.A. et al., 2012)	Гены, регулируемые с-МЫС, экспрессия которого снижена в 4,8 раз (Zeller K.I. et al., 2003; Kaur M. & Cole M.D., 2013; Okuyama H. et al., 2010)
Гены, повышение которых связано с трансформацией клеток через RHOA (Berenjeno I.M. et al., 2007)	
Маркеры нестабильного типа саркомы Юинга (Ferreira V.I. et al., 2008) и синовиальной саркомы (Nielsen T.O. et al., 2002)	
Кластер генов-маркеров рака молочной железы и стволовых клеток рака	

Отбор культуры клеток трансформированных ММСК ЖТ, способной к росту на бессывороточной среде

Перед проведением лентивирусной трансдукции провели скрининг на способность шести исследуемых клеточных линий трансформированных ММСК ЖТ человека расти в базовой ростовой среде (среда DMEM, 4 mM L-глутамин, 100 мг/л амикацин) с низким содержанием сыворотки. Способность клеток расти в суспензии на минимальном количестве сыворотки крови или ее заменителях является важной характеристикой для последующего их применения в биотехнологии.

Наблюдения показали, что при посадке клеток для их адгезии и сохранения нормальных пролиферативных характеристик, концентрация сыворотки крови в ростовой среде не должна быть ниже 5%. Клетки трансформированных ММСК плохо адаптируются к сниженной концентрации ЭТС в ростовой среде. Из всех культур трансформированных ММСК ЖТ человека только клетки культур VA18_2 и VA18_5 показали высокую скорость пролиферации при содержании ЭТС в культуральной среде 0,1% и 0% по сравнению с контролем и другими культурами спонтанно трансформированных ММСК ЖТ человека. Остальные культуры либо прекращали пролиферацию после снижения концентрации сыворотки, либо она значительно замедлялась. В подобранных условиях эксперимента клетки моноклональной культуры VA18_2 обладали наилучшими пролиферативными характеристиками по сравнению с контролем (рисунок 6) и остальными исследо-

ванными культурами спонтанно трансформированных ММСК ЖТ человека (данные не представлены).

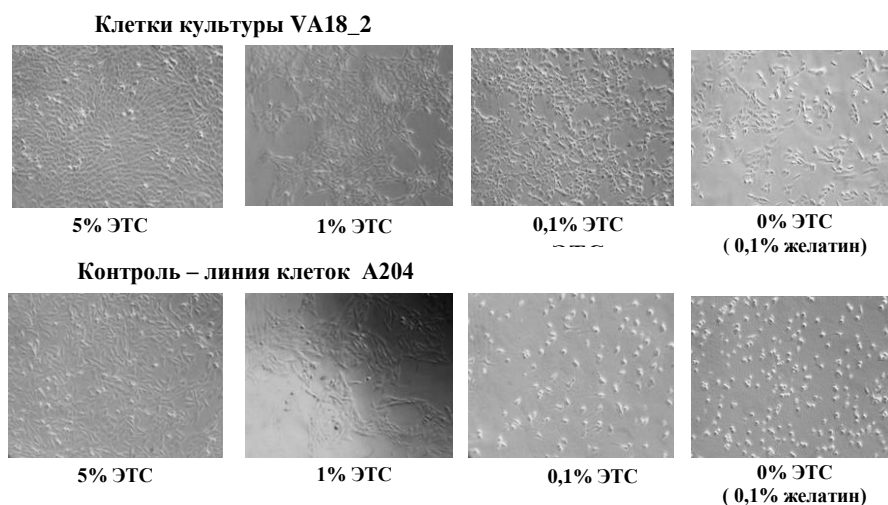


Рисунок 6. Рост культуры спонтанно трансформированных ММСК ЖТ человека VA18_2 и клеток линии A204 при разных концентрациях ЭТС в культуральной среде. Срок культивирования на фотографиях – 72 часа.

Трансдукция культуры клеток спонтанно трансформированной культуры ММСК ЖТ человека VA18_2 лентивирусным вектором с репортерным геном TagGFP2

Культуру неопластических клеток VA18_2 трансдуцировали концентрацией лентивируса (MOI) равной 5, 10, 20, 40 и 50 в трех повторностях. Такие условия по данным литературы обеспечивают эффективную трансдукцию нормальных ММСК человека (рисунок 7).

Результативность и эффективность трансдукции культуры при разных MOI, а также интенсивность флуоресценции по сравнению с контрольной группой клеток оценивали с помощью флуоресцентной микроскопии и проточной цитометрии. Обнаружено, что флуоресценция проявляется на 3-4 день после трансдукции, максимум флуоресценции клеток наблюдается на 7-ой день (рисунок 7), что связано с активацией транскрипции гена зеленого флуоресцентного белка. Цитотоксического воздействия на клетки при трансдукции не наблюдалось даже при высокой концентрации лентивируса.

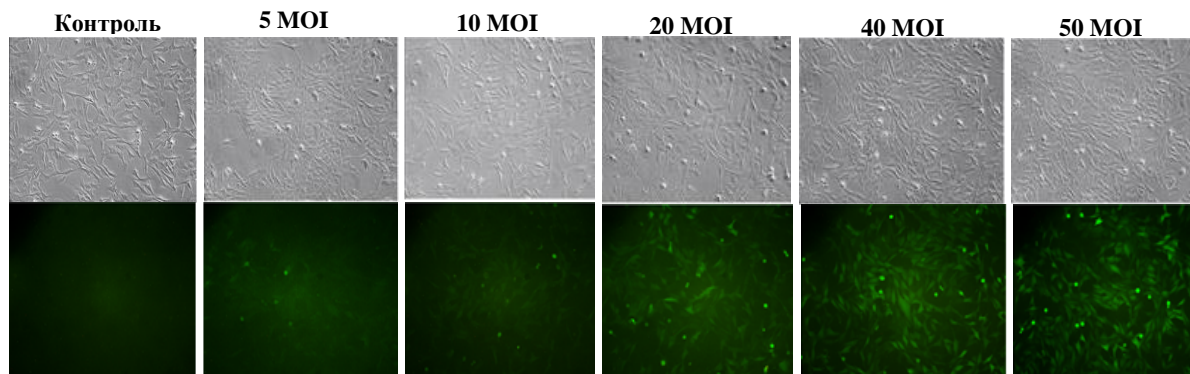


Рисунок 7. Экспрессия TagGFP2 после трансдукции культуры клеток спонтанно трансформированной культуры ММСК ЖТ человека VA18_2 лентивирусным вектором при разных MOI.

Также с увеличением MOI пропорционально возрастала интенсивность флуоресценции клеток (рисунок 8А), что соответствует большему количеству интегрированных копий трансгена в геном. При 50 MOI достигалась максимальная эффективность, а также максимальная интенсивность флуоресценции, что должно соответствовать максимальной экспрессии трансгена (рисунок 8Б). Дальнейшее увеличение MOI (выше значения 50) не

приводит к значительному увеличению процента флуоресцентных клеток, так как график эффективности выходит на плато.

Таким образом, концентрация лентивируса в 50 MOI признана оптимальной для поставленной задачи, так как позволяет получить максимально высокий уровень наработки потенциального терапевтического белка при сохранении жизнеспособности и пролиферативных свойств клеток. Эту концентрацию лентивирусного вектора использовали во всех последующих экспериментах.

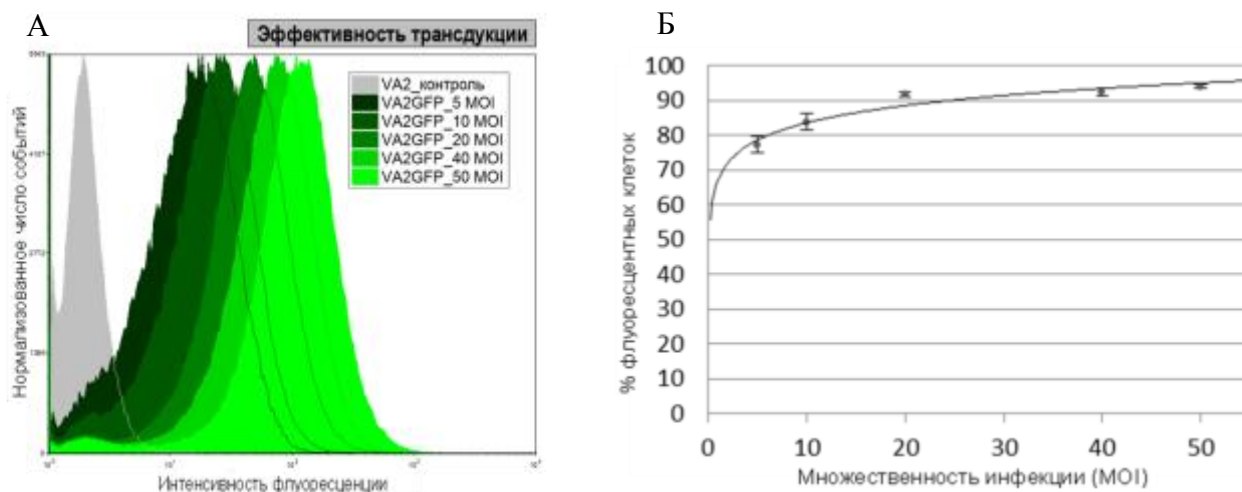


Рисунок 8. Трансдукция культуры клеток спонтанно трансформированной ММСК ЖТ человека А) Гистограмма цитометрического анализа трансдуцированных клеток культуры VA18_2 при разных MOI. Б) График эффективности трансдукции. На графике указаны средние значения эффективности трансдукции ± стандартная ошибка. Средняя эффективность трансдукции в эксперименте составляла: при 5 MOI — 77,25%, при 10 MOI — 83,81%, при 20 MOI — 91,68%, при 40 MOI — 92,28%, при 50 MOI — 94,01%.

Анализ стабильности трансдукции и экспрессии трансгена при длительном культивировании трансформированных ММСК ЖТ человека линии VA18_2

Культуру клеток линии VA18_2, трансдуцированных концентрацией лентивируса в 50 MOI культивировали в течение 20 пассажей в базовой ростовой среде (5% ЭТС). Обнаружили, что при стандартной процедуре пассирования процент флуоресцентных клеток в культуре со временем (~20 пассажей) падает. С помощью проточной цитометрии найдено, что процент флуоресцентных клеток из всей популяции трансдуцированных клеток на 5-пассаже составляет – 80,89±3,05%, на 10-м пассаже – 77,48±3,08%, на 20-м пассаже – 59,64±4,12%. Для решения проблемы падения процента флуоресцентных клеток в культуре необходимым стал этап селекции клеток после трансдукции.

Селекция клеток трансформированных ММСК ЖТ человека культуры VA18_2, стабильно трансдуцированных лентивирусным вектором с репортерным геном TagGFP2

Клетки культуры VA18_2 растили в базовой ростовой среде при стандартных условиях культивирования. Затем клетки снимали с подложки стандартным способом и рассаживали в низкой плотности на три 96-луночных плашки. Клетки затем культивировали в течение 7 суток до появления крупных флуоресцентных колоний, которые оценивали визуально с помощью флуоресцентной микроскопии по яркости флуоресценции клеток, скорости роста колонии и отсутствию несветящихся клеток. Таким образом, выделили четы-

ре трансдуцированных и хорошо флуоресцирующих культур, которые обозначили как VA2GFP_1k, VA2GFP_2k, VA2GFP_3k, VA2GFP_4k. В дальнейшем их культивировали в базовой ростовой среде в течение 25 пассажей. С помощью проточной цитометрии показано, что отобранные культуры сохраняют стабильную экспрессию трансгена. Процент флуоресцентных клеток в исследуемых моноклональных культурах остается высоким при сроке культивирования продолжительностью до 25 пассажей (рисунок 9).

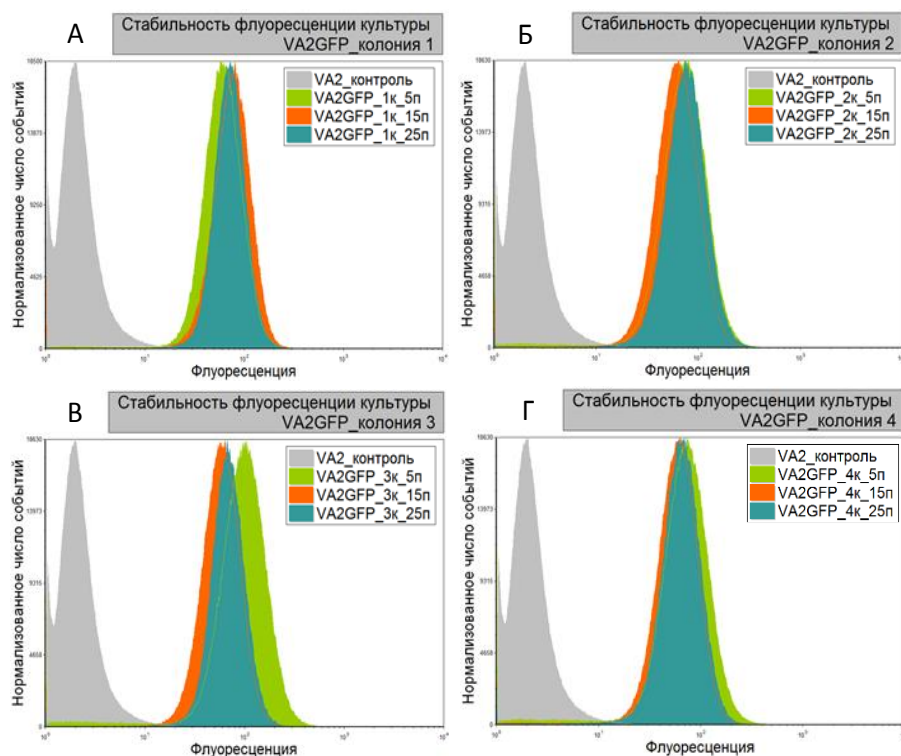


Рисунок 9. Гистограммы цитометрического анализа моноклональных культур, полученных из VA18_2 спонтанно-трансформированных ММСК ЖТ человека, трансдуцированных концентрацией лентивируса pLVT-TagGFP2-N в 50 MOI. Срок культивирования – 25 пассажей в базовой ростовой среде. Эффективность трансдукции составила: 5 пассаж: А – 98,19%. Б – 96,71%. В – 96,89%. Г – 96,09%. 15 пассаж: А – 98,3%. Б – 98,84%. В – 98,97%. Г – 98,72%. 25 пассаж: А – 99,5%. Б – 99,37%. В – 99,35%. Г – 98,54%.

В дальнейшем выделенные моноклональные культуры VA2GFP_1k, VA2GFP_2k, VA2GFP_3k, VA2GFP_4k использовали в экспериментах по количественной оценке копийности трансгена в клетках, и соответствующего уровня продукции белка при длительном культивировании.

Количественная оценка копийности и продуктивности трансгена в клетках трансдуцированных моноклональных культур VA2GFP_1k, VA2GFP_2k, VA2GFP_3k и VA2GFP_4k при длительном культивировании

Анализ копийности трансгена в клетках в условиях длительного культивирования на 5, 15 и 25 пассажах проводили с помощью количественной ПЦР в реальном времени в клетках всех четырех моноклональных культур VA2GFP_1k, VA2GFP_2k, VA2GFP_3k и VA2GFP_4k. Количество встроившихся копий трансгена на клетку определяли по методу построения калибровочной кривой по десятикратным разведениям лентивирусной плазмиды и подсчета соответствующего числа копий относительно концентрации вектора в ПЦР реакции. В среднем при трансдукции лентивирусным вектором в 50 MOI по всем моноклональным культурам число копий на клетку составляло на 5-м пассаже $24,96 \pm 3,62$; на 15-м пассаже $27,09 \pm 3,77$; на 25-м пассаже $46,37 \pm 6,04$ (рисунок 10А).

Обнаружена тенденция к увеличению числа копий трансгена на клетку с пассированием в моноклональных культурах. Увеличение копийности предположительно происходит в результате амплификации участка трансгена вследствие хромосомной нестабильности клеток.

Продуктивность трансгенного белка TagGFP2 в условиях длительного культивирования на 5, 15 и 25 пассажах измеряли в 3-х повторностях с помощью флуориметрии лизатов трансдуцированных клеток с последующим вычислением концентрации белка по калибровочной кривой для стандартных разведений TagGFP2.

Измеренное количество белка нормировали по количеству в нанограммах на 1×10^6 клеток. По результатам анализа продуктивности трансгена показано, что в среднем при выбранных условиях трансдукции лентивирусным вектором в 50 MOI по всем моноклональным культурам продукция TagGFP2 в $\text{нг}/1 \times 10^6$ клеток составила на 5-м пассаже – $657,65 \pm 91,56$, на 15-м пассаже – $970,47 \pm 67,43$, на 25-м пассаже – $973,67 \pm 54,63$ (рисунок 10Б).

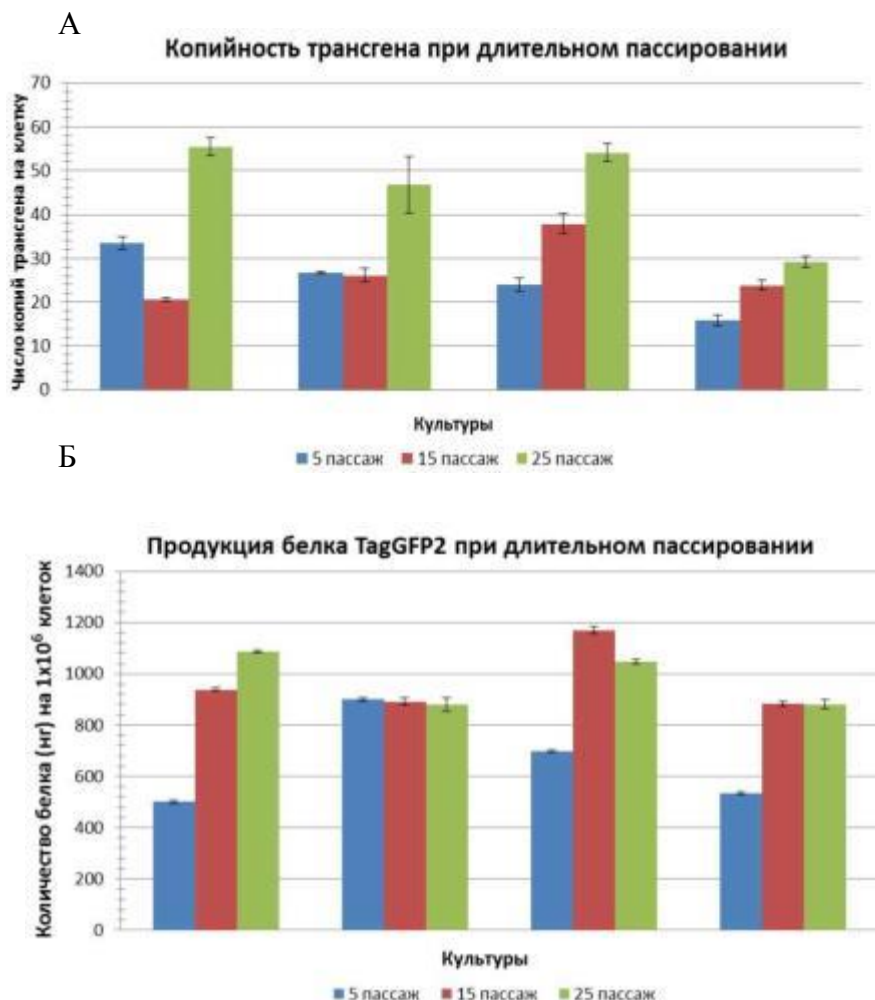


Рисунок 10. Количественная оценка копийности и продуктивности трансгена TagGFP2-N в моноклональных культурах VA2GFP_1k, VA2GFP_2k, VA2GFP_3k и VA2GFP_4k при длительном культивировании. А - Диаграмма анализа копийности. Бар – среднее число копий на клетку \pm ошибка среднего. Б – Количественный анализ продукции трансгенного белка TagGFP2. Бар – среднее количество белка TagGFP2 в нг на 1×10^6 клеток \pm ошибка среднего.

Таким образом, клетки культуры VA18_2 спонтанно-трансформированных ММСК ЖТ человека способны эффективно трансдуцироваться лентивирусными частицами и сохранять высокий процент флуоресцентных клеток в культуре при предварительном отборе стабильно флуоресцирующих клонов. После трансдукции и последующей селекции получили трансгенную клеточную систему, которая способна высокоэффективно экспрессировать трансген и нарабатывать трансгенный белок без потери жизнеспособности и высокого уровня пролиферации.

ВЫВОДЫ

1. Трансформированные ММСК ЖТ человека характеризуются высокой хромосомной нестабильностью. Модальное число хромосом на клетку варьирует от 73 до 91. Встречаются гигантские многоядерные клетки с числом хромосом больше 100.
2. В трансформированных ММСК ЖТ наблюдается множество хромосомных aberrаций. Процент клеток с aberrантными хромосомами в среднем составляет 47,4% по всем культурам (от 11,4% до 86,7%). Из всех хромосомных аномалий 46,41% составляют полицентрики, 30,94% двойные микрохромосомы, 3,38% кольцевые хромосомы, 18,77% другие хромосомные aberrации (одно- и дву-хроматидные разрывы, межхромосомные хроматидные обмены и др.).
3. Сравнительный анализ транскриптома показал статистически значимое повышение экспрессии генов 70 CIN (гены, ассоциированные с хромосомной нестабильностью), а также гиперэкспрессию генов, связанных с амплификацией центросом и мультиполярным митозом (AURKA, AURKB и др.).
4. Спонтанная трансформация ММСК ЖТ человека ассоциируется с нарушениями в сигнальных путях АКТ и RHOA, а также RAS (RalA и RalB), ATR/ATM и E2F.
5. Изменение экспрессии большинства из 30-ти наиболее значимо изменившихся по экспрессии транскриптов (согласно статистике SAM) ассоциировано по данным литературы с неопластической трансформацией клеток. Aberrантная экспрессия 6 генов из этой группы (HSPB6, PLAC9, FEZ1, DTWD1, APH1A, ATP5L) ранее не упоминалась в литературе в связи с неопластической трансформацией. Данные гены являются новыми потенциальными маркерами трансформации ММСК ЖТ человека
6. Анализ эффективности трансдукции культур лентивирусными частицами показал, что при использовании 50 MOI эффективно трансдуцируется ~95% трансформированных ММСК ЖТ человека.
7. После селективного отбора трансдуцированных при 50 MOI лентивируса клонов трансформированных ММСК ЖТ можно получить культуры, стабильно сохраняющие продуктивность трансгена на уровне ~1 мг внутриклеточного белка на 1×10^6 клеток в течение 25 пассажей (~6 месяцев).

ПРИМЕНЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ И НАУЧНЫХ ВЫВОДОВ

1. Результаты настоящего исследования могут быть использованы при дальнейших фундаментальных и прикладных исследованиях спонтанной трансформации ММСК человека.
2. В настоящем исследовании выявлено, что спонтанная трансформация ММСК человека связана с нарушениями в сигнальных путях АКТ и RHOA, RAS (RalA и RalB), ATR/ATM и E2F. Дальнейшие исследования изменений в экспрессии ключевых генов этих сигнальных путей позволят выявить возможную связь процессов, наблюдаемых при трансформации ММСК человека, и процессов, наблюдаемых при саркомогенезе.
3. В настоящем исследовании обнаружено высокозначимое изменение экспрессии 6 генов (HSPB6, PLAC9, FEZ1, DTWD1, APH1A, ATP5L), которые ранее не обсуждались в опубликованных работах по неопластической трансформации клеток человека. На основе 30-ти наиболее значимо изменивших экспрессию генов, в которые входят названные 6, может быть сформирована панель маркеров трансформации ММСК человека.
4. Результаты исследования эффективности лентивирусной трансдукции трансфор-

мированных ММСК человека показали, что на их основе возможно создание эффективной системы экспрессии терапевтических рекомбинантных белков.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные в изданиях, рекомендованных ВАК:

1. **Омельченко Д.О.**, Ржанинова А.А., Федюнина И.А., Ржанинова Е.Е., Кириенко Е.Е., Гольдштейн Д.В. Анализ хромосомного набора и aberrаций в спонтанно иммортализованных мультипотентных мезенхимных стромальных клетках из разных тканей человека // **Медицинская генетика**. 2012. Т. 11. № 11. С. 32-36.
2. Ржанинова А.А., **Омельченко Д.О.**, Федюнина И.А. Неопластическая трансформация мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток в культуре *in vitro* // **Медицинская генетика**. 2013. Т. 12. № 3. С. 20-28.
3. **Омельченко Д.О.**, Ржанинова А.А., Гольдштейн Д.В. Сравнительный парный анализ транскриптома спонтанно трансформированных мультипотентных стромальных клеток жировой ткани человека // **Генетика**. 2014. Т. 50. № 1. С.106-115.

Публикации в других изданиях:

4. **Омельченко Д.О.**, Ржанинова А.А., Федюнина И.А., Ратушный А.Ю., Гольдштейн Д.В. Эффективность лентивирусной трансдукции спонтанно трансформированных мультипотентных мезенхимных стромальных клеток жировой ткани (ММСК ЖТ) человека // **Медицинская генетика** (тезисы конкурсной конференции молодых ученых ФГБУ «МГНЦ» РАМН). 2013. С. 6.
5. A. Rzhhaninova, **D. Omelchenko**, I. Fedyunina, D. Goldshtein Spontaneous transformation of cultured MSCs is the result of cellular stress but not replicative senescence // **4th International Congress on Stem Cells and Tissue Formation**. 2012. С. 204.
6. **Омельченко Д.О.**, Ржанинова А.А., Федюнина И.А., Кириенко Е.Е., Гольдштейн Д.В. Цитогенетическое исследование спонтанно трансформированных периваскулярных ММСК из разных тканей человека // **Медицинская генетика** (тезисы конкурсной конференции молодых ученых ФГБУ «МГНЦ» РАМН). 2011. С.16-17.
7. **Омельченко Д.О.**, Ржанинова А.А., Федюнина И.А., Кириенко Е.Е., Гольдштейн Д.В. Цитогенетическое исследование клеточных линий спонтанно иммортализованных перипитов из ММСК разных тканей человека // **V Ежегодный Международный Симпозиум «Актуальные вопросы генных и клеточных технологий»** (тезисы). 2012. С. 42.
8. **Омельченко Д.О.**, Ржанинова А.А., Федюнина И.А., Ржанинова Е.Е., Гольдштейн Д.В. Сравнительный парный анализ профиля транскрипции генов спонтанно иммортализованных ММСК жировой ткани человека // **Медицинская генетика** (тезисы конкурсной конференции молодых ученых ФГБУ «МГНЦ» РАМН). 2012. С. 11.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ММСК – мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки

ЖТ – жировая ткань

Break-fusion-bridge (BFB) cycle – цикл разрыва-слияния-перемычки хромосом

Epithelial-mesenchymal transition (EMT) – эпителиально-мезенхимный переход

Significance analysis of microarrays (SAM) – статистический анализ микрочиповых данных для определения дифференциально экспрессированных транскриптов

False discovery rate (FDR) – процент ложных находок при множественном сравнении

Fold change (FC) – кратность изменения экспрессии Gene set enrichment analysis (GSEA) – статистический анализ представленности групп дифференциально экспрессированных генов, соответствующих коллекциям базы данных MSigDB

Gene Ontology (GO) overrepresentation analysis – анализ представленности дифференциально экспрессированных генов по категориям в базе данных GO

Gene set enrichment analysis (GSEA) – статистический анализ представленности групп дифференциально экспрессированных генов, соответствующих коллекциям базы данных MSigDB

Variance-stabilizing transformation (VST) – трансформация, стабилизирующая дисперсию данных

Robust spline normalization (RSN) – робастная нормализация сплайна