

УДК 577.218:57.086.835

Генетически модифицированная клеточная линия с гиперэкспрессией гена *MYC*

Д.С. Долгашева^{1,2}, Е.В. Сухинина^{3,4}, Е.А. Кравцова^{1,2}

Научный руководитель: профессор, д.б.н., Н.В. Литвяков^{1,2}

¹НИИ онкологии, Томский НИМЦ,

Россия, г. Томск, пер. Кооперативный 5, 634050

²Национальный исследовательский Томский государственный университет

Россия, г. Томск, пр. Ленина, 36, 634050

³Центр биологических исследований и биоинженерии, СГМУ

Россия, г. Томск, Московский тракт 2, 634050

⁴Научно-исследовательская школа химической и биомедицинской инженерии,

Национальный исследовательский Томский политехнический университет

Россия, г. Томск, пр. Ленина, 30, 634050

E-mail: normikus.18.97@gmail.com

Genetically modified cell line with *MYC* gene hyperexpression

D.S. Dolgasheva^{1,2}, E.V. Sukhinina^{3,4}, E.A. Kravtsova^{1,2}

Scientific Supervisor: Prof., Dr., N.V. Litvyakov^{1,2}

¹Tomsk Cancer Research Institute, Russia, Tomsk, Kooperativny str., 5, 634050

²Tomsk State University, Russia, Tomsk, Lenina str., 36, 634050

³Center of Bioscience and Bioengineering, Russia, Tomsk, Moskovsky trakt, 2, 634050

⁴Research School of Chemical and Biomedical Engineering, Russia, Tomsk, Lenina str., 30, 634050

E-mail: normikus.18.97@gmail.com

Abstract. We have previously shown that cell lines carrying amplifications of two or more stemness genes are capable of dedifferentiation with the formation of mammospheres. The BT549 cell line has amplification of only one stemness gene, *KLF5*, and is incapable of dedifferentiation. In the present study, a monoclonal breast cancer cell line BT-549_Myc9 with increased expression of *MYC* gene was established by CRISPR/SAM activation. BT-549_Myc9 cells showed an increased proliferation rate in vitro. *MYC* gene overexpression led to an increase in the CD44 + CD24 stem cell fraction and an increase in the number and diameter of mammospheres formed by BT-549_Myc9 cells. This effect was enhanced by IL6 stimulation. We hypothesized that *MYC* gene activation increases cancer cell plasticity and facilitates cell dedifferentiation, namely, facilitates the transition of a differentiated cancer cell into a stem cell.

Key words: *MYC* gene, CRISPR-based synergistic activation mediator, breast cancer cell, dedifferentiation.

Введение

Известно, что ген *MYC* связан со стволовостью, а его aberrантная экспрессия ассоциирована с неконтролируемым ростом и делением клеток. Так повышенная экспрессия *MYC* наблюдается более чем в 70 % случаев онкологических заболеваний [1]. Как правило, *MYC* участвует в канцерогенезе совместно с другими онкогенами, однако точный механизм его участия в прогрессировании опухоли не установлен. Ранее мы показали, что клеточные линии, несущие амплификации двух и более генов стволовости, способны дедифференцироваться с образованием маммосфер. С помощью метода CRISPER/Cas9 SAM-активации была получена генетически модифицированная клеточная линия BT549_Myc9 с гиперэкспрессией гена *MYC*. Согласно нашей гипотезе, ген *MYC* играет ключевую роль в пластичности опухолевых клеток. А именно, активация *MYC* помогает опухолевым клеткам сохранять свою пластичность и способность к дедифференцировке. Таким образом, целью

настоящей работы явилась оценка способности клеток BT-549_Myc9 с SAM-активированной экспрессией гена *MYC* к дедифференцировке и образованию маммосфер.

Материалы и методы исследования

В работе использовали опухолевые клеточные линии BT-549 и 293T. Клетки выращивали в стандартных условиях в полной среде DMEM/F12, дополненной 10 % FBS, 1 % GlutaMax. Клоны клеток BT-549 с повышенной экспрессией гена *MYC* получали с помощью системы Synergistic Activation Mediator (SAM) на основе CRISPR.

На первом этапе получали клетки BT-549 со стабильной экспрессией компонентов для активации SAM. Для клонирования использовали 5× буфер для лигирования Quick (Евроген), 10× буфер для лигирования T4 (Евроген), BsmBI (Thermo Scientific), лигазу T7 и полинуклеотидкиназу T4 (NEB, Англия). Плазмиды выделяли набором Plasmid Miniprep (Евроген). Для размножения векторов компетентные клетки *Escherichia coli* Stbl3 трансформировали методом теплового шока в присутствии CaCl₂. Лентивирусные векторы получали путем трансфекции 293T с помощью Metafectene (Biontex, Германия). Далее смесь лентивирусных векторов трансдуцировали клетки BT-549 со стабильной экспрессией компонентов SAM. Селекцию проводили в течение 14 дней. Моноклональные клеточные линии получали методом серийных разведений.

Тотальную РНК выделяли набором RNeasy Mini Kit Plus (Qiagen, Германия). Для изучения экспрессии с-Мус проводили иммунофлуоресцентный анализ и Вестерн-блот-анализ. Отбор целевых клеток осуществляли на сортировщике SH800 (Sony, США). Количественное определение уровня экспрессии *MYC* проводили методом Taq-man ПЦР на приборе RotorGene 6000 (Corbett Research, Австралия). Транскриптомный анализ экспрессии генов проводили на микрочипах Clariom S Assays. Профиль экспрессии маркеров клеточной поверхности определяли на проточном цитометре Cytotflex (Beckman Coulter, США). Анализ пролиферации проводили методом окрашивания белка сульфородамино В (SRB). Способность модифицированной линии инициировать вторичный рост опухоли изучали методом формирования маммосферы. Также способность клеток индуцировать рост опухоли была изучена на модели ксенотрансплантата *in vivo*.

Результаты

Было получено четыре клона клеток BT549 с гиперэкспрессией гена *MYC*. По данным RTqPCR, клон BT-549_Myc9 показал самый высокий уровень экспрессии гена *MYC* среди других (в 3 и более раза выше, чем в клетках дикого типа). Вестерн-блот и иммунофлуоресцентный анализы также показали повышенный уровень белка в модифицированной линии (рис. 1).

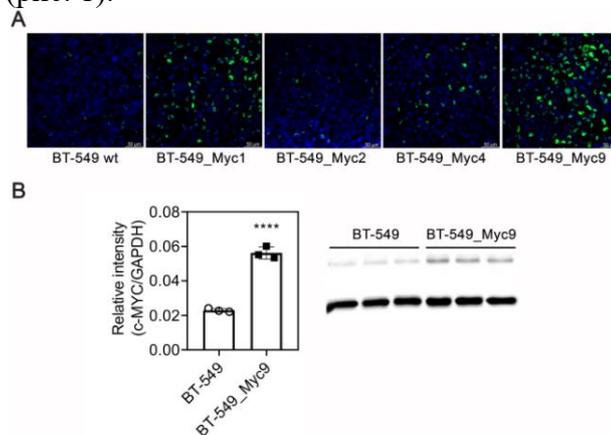


Рис. 1. Анализ экспрессии с-Мус в моноклональных клеточных линиях BT-549 wt и BT-549 после SAM-активации гена *MYC*. Примечание: (А) Иммунофлуоресцентный анализ экспрессии с- Мус; (В) Вестерн-блот-анализ экспрессии с- Мус

Активация *MYC* привела к увеличению скорости пролиферации клеток в 1,2 раза – время удвоения уменьшилось с 2, 3 суток для клеток дикого типа, и до 2 суток для модифицированной линии (рис. 2 А).

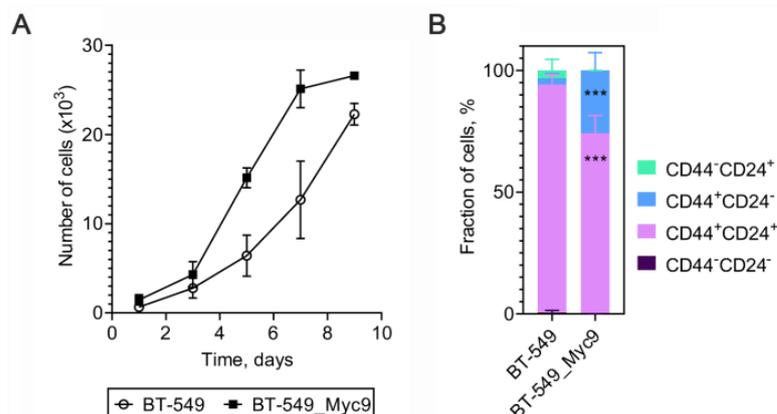


Рис. 2. Сравнительная характеристика моноклональной клеточной линии BT-549_Myc9. Примечание: (А) Скорость пролиферации клеточных линий BT-549 wt и BT-549_Myc9; (В) Профиль поверхностной экспрессии BT-549 wt и BT-549_Myc9. Данные представлены как среднее \pm SD. $n=3$, * $p<0,05$

Анализ субпопуляционного состава показал, что клетки дикого типа BT-549 преимущественно являются прогениторными ($CD44^+CD24^+$) ($93,5\pm 4,1\%$). После SAM-активации гена *MYC* доля клеток $CD44^+CD24^+$ снизилась до $74,2\pm 7,2\%$, а доля $CD44^+CD24^-$, соответствующих опухолевым стволовым клеткам, увеличилась с $2,7\pm 1,9\%$ до $25,8\pm 7,3\%$. При этом у линии BT-549_Myc9 клетки $CD44^-$ практически отсутствовали (рис. 2 В).

Показано, что клетки BT-549_Myc9 имеют тенденцию к увеличению образования маммофер в присутствии ИЛ6. Клетки $CD44^+CD24^+$, отсортированные из линии BT-549_Myc9, образуют больше маммофер по сравнению с клетками $CD44^+CD24^+$ дикого типа. Стимуляция ИЛ6 приводит к образованию маммофер большего диаметра клетками BT-549_Myc9, но не оказывает влияния на маммоферы клеток дикого типа. Отмечено, что маммоферы BT-549_Myc9 демонстрируют тенденцию к агрегации независимо от добавления ИЛ-6, что может быть связано с ключевой ролью c-Myc в клеточной адгезии.

Эксперимент на животных установил, что клетки BT-549_Myc9 могут индуцировать рост опухоли у мышей с иммунодефицитом и показали увеличение скорости роста опухоли по сравнению с родительскими клетками BT-549.

Заключение

В результате проведенных исследований с помощью системы CRISPR/SAM-активации была создана моноклональная клеточная линия опухоли молочной железы BT-549_Myc9 с усиленной экспрессией гена *MYC*. Клетки BT-549_Myc9 демонстрировали увеличение скорости пролиферации *in vitro*. Таким образом, сверхэкспрессия *MYC* в клетках опухоли молочной железы связана с увеличением субпопуляции опухолевых стволовых клеток, это способствует маммоферообразованию и росту опухоли, что подтвердило нашу гипотезу.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, соглашение от 29.09.2021 № 075-15-2021-1073.

Список литературы

1. Llombart V., Mansour M.R., Therapeutic targeting of "undruggable" *MYC* // EBioMedicine. – 2022. – V. 75. – P. 103756.