

Exosome-mediated *in vitro* *BCR-ABL* p210 transcript horizontal transfer between leukemic and bone marrow stromal cells

Anna N. Parfenenkova, Ildar M. Barkhatov, Anton A. Kremlev, Boris V. Afanasyev

Raisa Gorbacheva Memorial Research Institute of Pediatric Oncology, Hematology and Transplantation, Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russia

Contact: Dr. Ildar M. Barkhatov, PhD

E-mail: i.barkhatov@gmail.com, ann.parfenen2018@gmail.com

Introduction

The key challenge of molecular genetics in oncohematology is determination of molecular markers, which can be applied to malignant cells in diagnostics of the disease is the analysis of molecular markers, which can be applied to malignant cells in diagnostics of the disease, its progression, and relapse risks. One of the most promising test subjects to approach this might be exosomes, extracellular membrane vesicles of 30-150 nm in size, that potentially contain such oncogenic markers. Exosomes are among important players in inter-cellular communication and are able to transfer a variety of biopolymers, which can potentially affect the results of minimal residual disease (MRD) determination. Since the main role in the regulation of hematopoiesis belongs to mesenchymal stromal cells (MSCs) of the bone marrow, we suggest that the exosomes that persist in the bone marrow, may be a source of the detectable transcript can be as and their migration into stromal microenvironment cells.

Materials and methods

Exosome isolation was performed by differential ultracentrifugation of K562 cell line (Chronic Myeloid Leukemia) conditional media. The isolated exosomal particles were analyzed using laser correlation spectroscopy approach including zeta-potential assessment to ensure electrokinetic capability to interact with biological systems. Transfer of *BCR-ABL* p210 transcript was performed in a 24-well plate. After that, 300 μ l of serum-free growth medium with exosomes (isolated from about 70 millions cells per well) was added. Co-cultivation of K562 and MSC was performed in a 24-well plate with inserts of semi-permeable membrane (pore diameter 0.4 μ m).

Results

The largest number of vesicles in the sample corresponded to a presumed size of exosomes with average diameters in the range of 52÷107 nm and a mean value of 79±20 nm. The results of the study showed that the distribution of the average sample size in diameter is in the range of 51.8÷107.0 nm and a mean value of 78.96±20.03 nm. The zeta potential corresponds to stable particles and is on mean equal to 29.±7. mV. According to Real-Time PCR, the relative representation of the *BCR-ABL* p210 chimeric transcript in exosomes ranged between 44÷864 copies/ml of conditioned medium with a median value of 154 copies. After MSCs co-cultivation with K562, the relative content of *BCR-ABL* p210 mRNA in recipient mesenchymal cells was between 0.3 to 11.4% of ABL1 level, with a median of 0.29%. As a result of exosome-mediated transfection, the relative content of the chimeric transcript in the MSCs of healthy donors ranged from 0.01 to 15.88%, with a median value of 0.11%.

Conclusions

Exosomal fraction of microvesicles of K562 contain the chimeric *BCR-ABL* p210 mRNA transcript, a marker of CML, and are able to its transfer to the bone marrow MSCs of healthy donors. It has been confirmed during as experiments of co-cultivation, and direct transfection with exosomes. The amount of transcript transferred to stromal cells is comparable to the one in CML patients with a minimal residual disease, which proves the potential role of exosomes in contribution to the results of MRD determination.

Keywords

Extracellular vesicles, exosomes, tumor exosomes, bone marrow stromal cells, cell-cell interactions.

Горизонтальный перенос химерного транскрипта *BCR-ABL* p210 между лейкозными и стромальными клетками костного мозга, опосредованный экзосомами, в модели *in vitro*

Анна Н. Парфененкова, Ильдар М. Бархатов, Антон А. Кремлев, Борис В. Афанасьев

НИИ детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р. М. Горбачевой, Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия

Введение

Ключевой задачей молекулярно-генетических исследований в онкогематологии является анализ молекулярных маркеров, характерных для трансформированных клеток, с целью диагностики заболеваний, а также свое-

временной оценки их прогрессии и риска развития рецидива. Одним из перспективных объектов для изучения, предположительно содержащих такие маркеры, являются экзосомы – мембранные везикулы, размеры которых находятся в интервале от 30 до 150 нм. Экзосомы являются важными участниками межклеточных

взаимодействий и способны к переносу различных биополимеров, которые также потенциально могут оказать влияние на интерпретацию оценки минимальной остаточной болезни. Поскольку основная роль в регуляции гемопоэза принадлежит мезенхимным стромальным клеткам (МСК) костного мозга, мы предполагаем, что возможным источником выявляемого транскрипта онкогена могут в том числе выступать как персистирующие в костном мозге экзосомы, так и их миграция в клетки стромального микроокружения.

Объекты и методы

Выделение экзосом производили методом дифференциального ультрацентрифугирования кондиционной среды культуры клеток хронического миелоидного лейкоза линии K562. Полученные частицы анализировали методом лазерной корреляционной спектроскопии. Для проверки стабильности частиц и способности их взаимодействия с биологическими системами был определен Дзета-потенциал. Эксперимент по переносу химерного транскрипта проводился в 24-луночном планшете. После этого вносили 300 мкл бессывороточной питательной ростовой среды с экзосомами (выделенных с порядка 70 млн клеток на лунку).

Кокультивирование K562 и МСК проводили в 24-луночном планшете с полунепроницаемыми перегородками (диаметр пор – 0,4 мкм).

Результаты

Наибольшее количество везикул в пробе соответствует размерам экзосом. Результаты исследования показали, что распределение среднего размера проб по диаметру находится в диапазоне 51,8÷107,0 нм со средним зна-

чением 78,96±20,03 нм. Дзета-потенциал соответствует стабильным частицам и в среднем равен – 29,3±7,4 мВ. По результатам количественной ПЦР в режиме реального времени содержание химерного транскрипта *BCR-ABL p210* в экзосомах колебалось в интервале 44÷864 копий/мл кондиционной среды со значением медианы 154 копии. После кокультивирования K562 и МСК относительное содержание *BCR-ABL p210* в клетках-мишенях стало равным 0,03÷11,4% относительно *ABL1* с медианой в 0,29%. В результате трансфекции экзосомами относительное содержание химерного транскрипта в МСК здоровых доноров находилось в интервале 0,01÷15,88% с медианой 0,11%, что соответствует положительному результату при определении МОБ и доказывает непосредственное участие экзосом в переносе.

Выводы

Экзосомальная фракция микровезикул K562 содержит химерный транскрипт *BCR-ABL p210*, маркер ХМЛ, и способна к его трансферу в МСК костного мозга здоровых доноров, что было определено во время экспериментов совместного культивирования клеток, а также посредством прямой трансфекции экзосомами. Количество транскрипта, перенесенного в стромальные клетки, сравнимо с таковым у пациентов с МОБ, что доказывает потенциальную возможность экзосом вносить вклад в результаты ее определения.

Ключевые слова

Внеклеточные везикулы, экзосомы, опухолеспецифичные экзосомы, стромальные клетки костного мозга, межклеточные взаимодействия.

Study of multipotent mesenchymal stromal cells as a cellular delivery system for antitumor drugs and their remote control activation

Oleksii O. Peltek, Timofey E. Karpov, Yana V. Tarakanichikova, Mikhail V. Zyuzin, Albert R. Muslimov

Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russia

Contact: Dr. Albert R. Muslimov

E-mail: albert.r.muslimov@gmail.com

Introduction

The effectiveness of a number of cytotoxic drugs directly depends on the concentration of the active substance in the tumor zone. However, an increase in the administered doses also leads to an increase in side effects in relation to healthy tissues. The solution can be a novel dosage form that would accumulate high local concentrations of cytostatic drugs in the tumor area without affecting the surrounding healthy tissue. To create such a drug delivery system, it is possible to utilize multipotent mesenchymal stromal cells (MMSCs) modified with hybrid polyelectrolyte microcapsules. MMSCs due to the effect of pathotropism are able to ensure active delivery of biologically active substances to the tumor site, while microcapsules have a high loading capacity and can protect carrier cells from the effects of the encapsulated drug. In this work, the microcapsules were additionally

modified with gold nanoparticles, which makes them sensitive to infrared radiation and allows to control the release of the drug. In this study, vincristine was used as a model drug with a dose-dependent effect.

Objects and methods

Capsules were synthesized using Layer-by-Layer technique (Polyarginine / Dextran sulfate) and sol-gel synthesis (Tetraethyl orthosilicate). The loading capacity of micrometer (1-2 microns) and submicron (500-600 nm) capsules was evaluated. We demonstrated that without an infrared laser irradiation of the capsules, a release of vincristine was less than 10%. Therefore, these capsules are non-toxic to carrier cells which was confirmed by cytotoxicological experiments. The effect of capsules on spontaneous and directed migration of MMSCs was studied and it was shown that at the ratio of cells to capsules of 1 to 10, there is no significant decrease in