ВЛИЯНИЕ СВЕРХЭКСПРЕССИИ ТЕСКАЛЦИНА НА ОСТЕОГЕННУЮ ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

В.В. Соловьева [1], К.Г. Колобынина [1], М.О. Гомзикова [1], Л.Г. Тазетдинова [1], М.Н. Журавлева [1], В.З. Слепак [2], А.А. Ризванов [1]

[1] Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия
[2] Медицинская школа Миллера при Университете Майами, Майами, США

Effect of tescalcin overexpression on osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells

V.V. Solovyeva [1], K.G. Kolobynina [1], M.O. Gomzikova [1], L.G. Tazetdinova [1], M.N. Zhuravleva [1], V.Z. Slepak [2], A.A. Rizvanov [1]

[1] Kazan (Volga region) Federal University, Russia, Kazan
[2] University of Miami Miller School of Medicine, Miami, USA

Тескалцин играет важную роль в пролиферации и дифференцировке некоторых видов клеток. Было показано участие тескалцина в сигнальных путях митоген-активируемой протеинкиназы, а также его взаимодействие с субъединицей 4 сигналосомы COP9 и белком NHE1. Поскольку тескалцин является одним из факторов, позволяющих из клеток-предшественниц одного вида получить в процессе дифференцировки различные специализированные виды клеток, это определяет интерес к его возможному использованию в генно-клеточной терапии для модуляции фенотипа клеток-мишеней. Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки из жировой ткани (ММСК-ЖТ) являются перспективным клеточным материалом для регенеративной медицины в связи со способностью к дифференцировке в остеогенном направлении. В нашей работе показано, что в культуре ММСК-ЖТ со сверхэкспрессией тескалцина наблюдалась значительно большая минерализация матрикса по сравнению с контрольными культурами. Это может свидетельствовать о том, что эктопическая сверхэкспрессия тескалцина может влиять на процесс остеогенной дифференцировки ММСК-ЖТ.

Ключевые слова: тескалцин, мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки, остеогенез, иммунофенотип, рекомбинантные лентивирусы, остеогенная дифференцировка.

Tescalcin plays an important role in the proliferation and differentiation of certain cell types. It is involved in the signaling pathways of mitogen-activated protein kinase and is reported to directly interact with subunit 4 of COP9 signalosome and Na/H exchanger NHE1. Since tescalcin is one of the factors that allow one type of progenitor cells differentiate into a variety of specialized cell types, it can be a potential molecular tool for modulation of phenotype of target cells. The ability of adipose-derived mesenchymal stem cells (ADSCs) to differentiate into osteogenic direction makes them a promising adult stem cell type for regenerative medicine and tissue engineering. Here we show that ADSCs with tescalcin overexpression had a significantly higher level of matrix mineralization compared with control ADSCs. This finding indicates that ectopic tescalcin overexpression might affect osteogenic differentiation of ADSCs.

Keywords: tescalcin, mesenchymal stem cells, osteogenesis, immunophenotype, recombinant lentiviruses, osteogenic differentiation.

Введение

Тескалцин (гомологичный кальцинейрину В белок 3, Calcineurin B homologous protein 3, CHP3) принадлежит семейству EF-hand Ca^{2+}/Mg^{2+}-связывающих белков, подсемейству кальцинейрина В, и представляет собой белок с молекулярной массой 24 кДа [1]. Тескалцин гомологичен трем Ca^{2+}-связывающим белкам: гомологичный кальцинейрину белок 1 (CHP1), гомологичный кальцинейрину белок 2 (CHP2) и кальцинейрин В (CnB), а также высококонсервативен у многих позвоночных организмов [2]. Исследования in vitro на клетках K562 показали, что сверхэкспрессия тескалцина вызывает фенотипические изменения, характерные для дифференцировки этих клеток по мегакариоцитарному пути. Соответственно, нокдаун тескалцина путем РНК-интерференции значительно замедлял процесс дифференцировки. Это позволило предположить, что тескалцин может непосредственно участвовать в регуляции экспрессии генов [3].

Описано взаимодействие тескалцина с субъединицей 4 сигналосомы COP9 [4], интегральным белком NHE1 (англ. Na^+/H^+ exchanger 1) [5-6] и его участие в сигнальных путях митоген-активируемой протеинкиназы (англ. Mitogen-activated protein kinase, MAPK) [3, 7]. Посредством взаимодействия с NHE1, тескалцин может оказывать влияние на важнейшие физиологические функции в организме: стабилизацию pH внутри клетки, активацию NHE1 в ответ на злокачественное перерождение клетки, обеспечение необходимого количества H^+ в тканях сердца [8].

Каскады MAPK регулируют ряд ключевых внутриклеточных сигнальных событий, включая пролиферацию, дифференцировку, выживание и апоптоз клеток. Было показано, что тескалцин контролирует экспрессию факторов транскрипции семейства Ets через PMA-индуцированный сигнальный путь экстраклеточно-регулируемой протеинкиназы (англ. Extracellular signal-regulated kinase, ERK) [3, 4]. Путь ERK является одним из пяти каскадов MAPK, идентифицированных у млекопитающих. Этот путь регулирует пролиферацию и дифференцировку остеобластов и мультипотентных мезенхимальных стромальных

e-mail: Albert.Rizvanov@kpfu.ru

клеток (ММСК) в процессе остеогенной дифференцировки по Ras-зависимому пути передачи сигнала [9]. Одним из ключевых факторов транскрипции, контролирующих остеогенную дифференцировку клеток, является Ets1, который активирует экспрессию щелочной фосфатазы и остеопонтина, а также позитивно регулирует PthR1, который играет важную роль в контроле внутриклеточного уровня кальция остеобластов.

Жировая ткань является богатым источником ММСК [10]. Отдельный интерес представляет остеогенный потенциал ММСК из жировой ткани (ММСК-ЖТ), так как именно дифференцировка в остеобласты находит применение в регенеративной медицине и тканевой инженерии [11, 12].

Целью данной работы явилось исследование влияния сверхэкспрессии или подавления экспрессии тескалцина на пролиферацию и способность к остеогенной дифференцировке ММСК, выделенных из жировой ткани человека.

Материал и методы

Получение рекомбинантных лентивирусов

Для получения рекомбинантных лентивирусов использовали следующие плазмиды: pMD2-VSV-G (оболочечная), pCMV-dR8.74 (упаковочная) и векторные pLenti-Tescalcin-GFP (кодирует кДНК гена тескалцина человека и гена *gfp*), pLenti-GFP (кодирует кДНК гена *gfp*), pLenti-Tescalcin-Knock_Down-GFP (кодирует киРНК к мРНК гена тескалцина человека и ген *gfp*). Для получения рекомбинантных лентивирусов проводили ко-трансфекцию с использованием кальций-фосфатного метода тремя плазмидами (оболочечная, упаковочная и векторная) пакующей линии клеток HEK293T (ATCC, CRL-11268) согласно стандартному протоколу, описанному ранее [13].

Выделение и культивирование ММСК из жировой ткани человека

Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК-ЖТ) были выделены по ранее описанному протоколу с оригинальными изменениями [14, 15]. Образцы подкожной жировой клетчатки были получены в ходе плановой косметической операции (липосакции). В стерильных условиях ламинарного бокса проводили отмывку липоаспирата от крови. Полученный гомогенный липоаспират ферментировали 0,2% раствором коллагеназы краба (159 ПЕ/мг, Биолот, Россия). ММСК культивировали в среде αMEM (ПанЭко, Россия), к которой было добавлено 10% сыворотки крови плодов коровы (Invitrogen, США), 2 мМ L-глутамина (ПанЭко, Россия), смесь антибиотиков пенициллина и стрептомицина (Биолот, Россия) при 37°С во влажной атмосфере с 5% содержанием CO_2. Через 24 ч. проводили замену питательной среды. После 5–7 дней инкубации констатировали формирование монослоя из клеток. Последующее пассирование и замену питательной среды проводили согласно стандартным протоколам. Морфологию клеток оценивали с помощью инвертированного микроскопа AxyObserver.Z1 (Carl Zeiss, Германия) с использованием программного обеспечения AxyoVision Rel. 4.8.

Генетическая модификация ММСК

ММСК-ЖТ культивировали в 6-луночном культуральном планшете до полуконфлюэнтной плотности. Клетки инфицировали рекомбинантными лентивирусами с множественностью инфекции (MOI) 10. Сортировку генетически модифицированных ММСК-ЖТ проводили по флуоресценции репортерного белка GFP с использованием прибора FACSAria (BD Biosciences, США).

Оценка жизнеспособности ММСК

ММСК-ЖТ высевали в количестве 5×10^3 кл/лунку 96-луночного планшета и культивировали при 37°С во влажной атмосфере, содержащей 5% CO_2. Жизнеспособность клеток через 48 ч. культивирования определяли с помощью реагента CellTiter 96® AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega, США) на микропланшетном ридере Infinite M200Pro (Tecan). Оптическую плотность в лунках измеряли в двухволновом режиме: основной фильтр – 490 нм, референс-фильтр – 700 нм. Эксперимент повторяли троекратно; для статистического анализа использовали метод t-критерия Стьюдента.

Определение иммунофенотипа ММСК

Экспрессию поверхностных антигенов ММСК-ЖТ оценивали методом проточной цитофлуориметрии. Клетки трипсинизировали и инкубировали в фосфатно-солевом буфере в течение 45 мин. с антителами к CD90 (PE-Cy5) (#328112, BioLegend), CD44 (PE), CD73 (APC), и негативным коктейлем (PE) (BD Stemflow™ Human MSC Analysis Kit, BD Biosciences, США). Негативный коктейль включал антитела к CD34, CD11b, CD19, CD45, HLA-DR. Анализ клеток проводили на проточном цитометре Guava easyCyte 8HT (Millipore, США) согласно инструкциям производителя.

Остеогенная дифференцировка ММСК

Для оценки влияния генетической модификации на процесс дифференцировки клеток в остеогенном направлении ММСК-ЖТ культивировали на полной среде αMEM в 24-луночном культуральном планшете до плотности клеточного монослоя 100%, после чего использовали среду для остеогенной дифференцировки StemPro® Osteogenesis Differentiation Kit (Gibco, США). Клетки поддерживали на среде для дифференцировки в течение 18 сут., меняя питательную среду раз в три дня. В качестве отрицательного контроля использовали ММСК-ЖТ, культивируемые на полной среде αMEM. Для определения минерализации, являющейся признаком остеогенной дифференцировки, ММСК-ЖТ окрашивали по von Kossa. Маркером остеогенной дифференцировки являлась продукция кальций-содержащего матрикса, окрашиваемого нитратом серебра в черный цвет. Результаты анализировали на инвертированном микроскопе AxyObserver.Z1 (Carl Zeiss, Германия) с использованием программного обеспечения AxyoVision Rel. 4.8.

Результаты и обсуждение

ММСК, выделенные из жировой ткани человека характеризуются фибробластоподобной морфологией. Иммуноцитофлуориметрический анализ показал, что большинство выделенных ММСК-ЖТ экспрессируют поверхностные антигены (CD-маркеры), характерные для ММСК человека: CD90, CD44, CD73 (рис. 1А–В). В то же время ММСК-ЖТ не экспрессировали антигены CD34, CD11b, CD19, CD45, HLA-DR (негативный коктейль) (рис. 1Г).

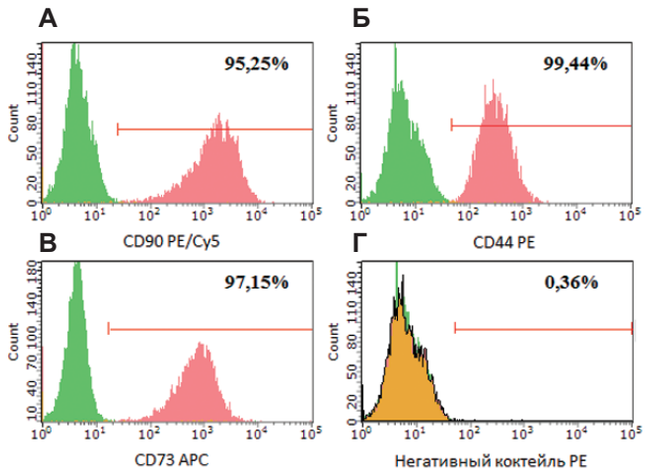

Рис. 1. Иммуноцитофлуориметрическая характеристика поверхностных антигенов (CD-маркеров) ММСК-ЖТ:
зеленая диаграмма – нативные ММСК-ЖТ (контроль фоновой флуоресценции);
красная диаграмма – ММСК-ЖТ, позитивные по
А – CD90 (95,25% позитивных клеток);
Б – CD44 (99,44% позитивных клеток);
В – CD73 (97,15% позитивных клеток);
Г – негативный коктейль: CD34, CD11b, CD19, CD45, HLA-DR (0,36% позитивных клеток)

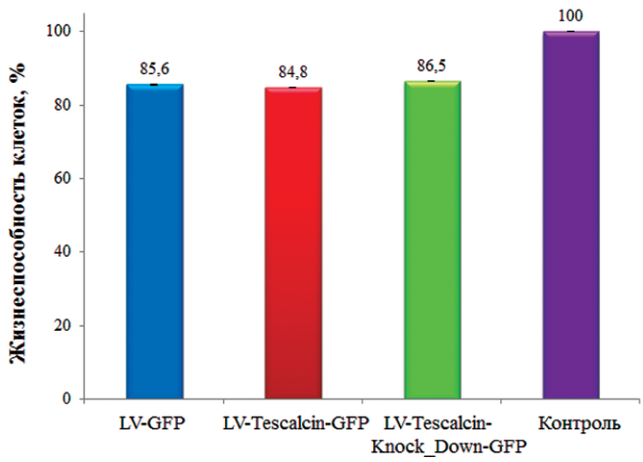

Рис. 2. Жизнеспособность нативных (контроль) и генетически модифицированных МСК-ЖТ (LV-GFP, LV-Tescalcin-GFP, LV-Tescalcin Knock_Down-GFP); результаты представлены в виде среднего значения ± стандартное отклонение (n = 3)

ММСК-ЖТ были модифицированы рекомбинантными лентивирусами LV-GFP, LV-Tescalcin-GFP, LV-Tescalcin-Knock_Down-GFP. Генетически модифицированные ММСК-ЖТ были отобраны путем сортировки с использованием прибора FACSAria (BD Biosciences) по флуоресценции репортерного белка GFP.

С помощью MTS-теста была проведена оценка жизнеспособности генетически модифицированных и нативных ММСК-ЖТ. Жизнеспособность нативных ММСК-ЖТ была принята за 100%. Жизнеспособность клеток после генетической модификации снижалась в среднем на 15% и составила: для ММСК-ЖТ, трансдуцированных LV-GFP, – 85,6%, LV-Tescalcin-GFP – 84,8%, LV-Tescalcin-Knock_Down-GFP – 86,5% (рис. 2). Основываясь на полученных данных можно сделать вывод, что генетическая модификация не оказывает существенного влияния на жизнеспособность ММСК-ЖТ.

В обычных условиях ММСК-ЖТ не экспрессируют тескалцин, его экспрессия показана лишь в некоторых опухолевых культурах клеток (HeLa, HL-60), а также в тканях сердца, слюнных и половых железах [16]. Однако эктопическая экспрессия тескалцина ММСК-ЖТ может оказывать влияние на различные сигнальные системы клетки.

При культивировании нативных и генетически модифицированных ММСК-ЖТ в среде для остеогенной дифференцировки наблюдали изменение формы клеток с веретеновидной на кубоидальную и полигональную, свойственную остеобластам.

Реакция von Kossa выявила наличие минеральных депозитов в культурах ММСК-ЖТ, подвергнутых остеогенной дифференцировке, в то время как в культурах, инкубировавшихся в контрольной среде, таковых не наблюдалось (рис. 3). В культуре ММСК-ЖТ со сверхэкспрессией тескалцина наблюдалась значительно большая минерализация матрикса, по сравнению с другими культурами ММСК-ЖТ. Этот результат может свидетельствовать о том, что сверхэкспрессия тескалцина усиливает процесс остеогенной дифференцировки ММСК-ЖТ.

Для изменения фенотипа клетка должна пройти пролиферативные и дифференцировочные изменения. Одним из основных сигнальных путей, принимающих участие в регуляции пролиферации и дифференцировки мезенхимных стволовых клеток, является путь митоген-активируемой протеинкиназы (MAPK). Также показано, что активация MAPK способствует дифференцировке других типов клеток, таких как нервные клетки, адипоциты, Т-клетки и клетки мышечной ткани [17].

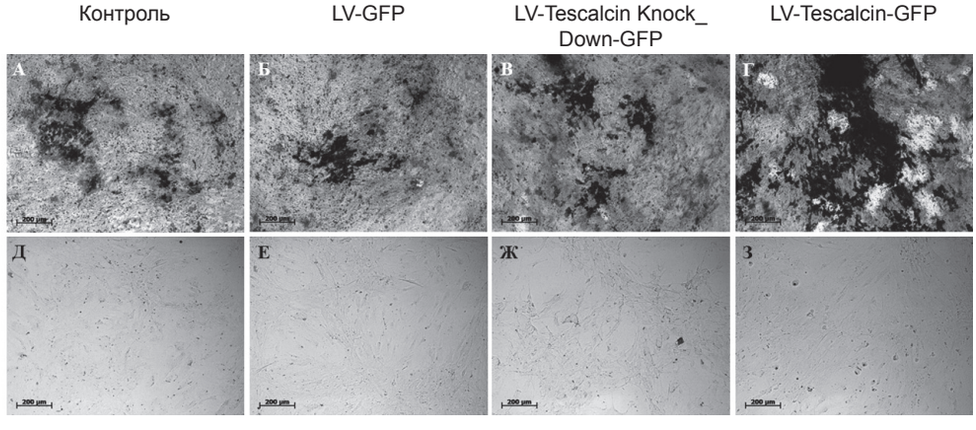

Рис. 3. ММСК-ЖТ после индукции остеогенной дифференцировки в течение 18 сут.:
А–Г – ММСК-ЖТ, культивируемые в остеогенной среде;
Д–З – ММСК-ЖТ, культивируемые в среде αMEM.
Цитохимическая реакция. Масштабный отрезок – 200 мкм

Известно, что тескалцин участвует в сигнальных путях MAPK. Таким образом, эктопическая экспрессия тескалцина может быть использована для модуляции процесса дифференцировки клеток.

Благодарности

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №15-44-02509. Работа выполнена в рамках программы повышения конкурентоспособности Казанского федерального университета и субсидии, выделенной Казанскому федеральному университету для выполнения государственного задания в сфере научной деятельности. Работа частично выполнена на оборудовании Междисциплинарного центра коллективного пользования Казанского федерального университета при финансовой поддержке государства в лице Министерства образования и науки России (ID RFMEFI59414X0003) и Научно-образовательного центра фармацевтики Казанского (Приволжского) федерального университета.

ЛИТЕРАТУРА**:**

1. Perera E.M., Martin H., Seeherunvong T. et al. Tescalcin, a novel gene encoding a putative EF-hand Ca(2+)-binding protein, Col9a3, and renin are expressed in the mouse testis during the early stages of gonadal differentiation. Endocrinology 2001; 142(1): 455-63.
2. Perera E.M., Bao Y., Kos L. et al. Structural and functional characterization of the mouse tescalcin promoter. Gene 2010; 464(1-2): 50-62.
3. Levay K., Slepak V.Z. Tescalcin is an essential factor in megakaryocytic differentiation associated with Ets family gene expression. J. Clin. Invest. 2007; 117(9): 2672-83.
4. Levay K., Slepak V.Z. Regulation of Cop9 signalosome activity by the EF-hand Ca^{2+}-binding protein tescalcin. J. Cell. Sci. 2014; 127(Pt 11): 2448-59.
5. Mailänder J., Müller-Esterl W., Dedio J. Human homolog of mouse tescalcin associates with Na(+)/H(+) exchanger type-1. FEBS Lett. 2001; 507(3): 331-5.
6. Li X., Liu Y., Kay C.M. et al. The Na^+/H^+ exchanger cytoplasmic tail: structure, function, and interactions with tescalcin. Biochem. 2003; 42(24): 7448-56.
7. Kato J.Y., Yoneda-Kato N. Mammalian COP9 signalosome. Genes Cells. 2009; 14(11): 1209-25.
8. Malo M.E., Fliegel L. Physiological role and regulation of the Na+/H+ exchanger. Can. J. Physiol. Pharmacol. 2006; 84(11): 1081-195.
9. Xu C., Zheng Z., Fang L. et al. Phosphatidylserine enhances osteogenic differentiation in human mesenchymal stem cells via ERK signal pathways. Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl. 2013; 33(3): 1783-8.
10. Масгутов Р.Ф., Богов А.А., Ризванов А.А. и др. Стволовые клетки из жировой ткани — биологические свойства и перспективы клинического применения. Практическая медицина 2011; 7(55): 18-20.
11. Масгутов Р.Ф., Салихов Р.З., Ризванов А.А. и др. Применение клеток стромальной васкулярной фракции жировой ткани при лечении полнослойного дефекта гиалинового хряща медиального мыщелка бедренной кости коленного сустава: клинический случай. Гены и клетки 2014; 9(3): 303-6.
12. Масгутов Р.Ф., Салихов Р.З., Плаксейчук Ю.А. и др. Применение клеток стромальной васкулярной фракции жировой ткани при ложном суставе бедренной кости: клинический случай. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия 2013; 8(3): 116-8.
13. Соловьева В.В., Исаев А.А., Генкин Д.Д. и др. Влияние рекомбинантного гистона H1.3 на эффективность лентивирусной трансдукции клеток человека in vitro. Клеточная трансплантология и тканевая инжененнрия 2012; 7(3): 151-4.
14. Solovyeva V.V., Salafutdinov I.I., Tazetdinova L.G. et al. Genetic Modification of Adipose Derived Stem Cells with Recombinant Plasmid DNA pBud-VEGF-FGF2 Results in Increased of IL-8 and MCP-1 Secretion. J.pure and applied microbiol. 2014; 8(Spl. Edn. 2): 523-8.
15. Solovyeva V.V., Salafutdinov I.I., Martynova E.V. et al. Human adipose derived stem cells do not alter cytokine secretion in response to the genetic modification with pEGFP-N2 plasmid DNA. World Applied Sciences J. 2013; 26(7): 968-72.
16. Levay K., Slepak V.Z. Up- or downregulation of tescalcin in HL-60 cells is associated with their differentiation to either granulocytic or macrophage-like lineage. Exp. Cell. Res. 2010; 316(7): 1254-62.
17. Jaiswal R.K., Jaiswa N., Bruder S.P. et al. Adult human mesenchymal stem cell differentiation to the osteogenic or adipogenic lineage is regulated by mitogen-activated protein kinase. J. Biol. Chem. 2000; 275(13): 9645-52.

Поступила: 21.09.2015