Передача РНК и белков через мембранные везикулы как один из возможных механизмов репрограммирования и эпигенетических изменений ядра клетки

Мембранные везикулы, образующиеся на поверхности эукариотической клетки, могут переносить различные молекулы и оказывать плейотропное действие на окружающие клетки [1, 2]. Известно, что поддержание плюрипотентности и недифференцированного состояния эмбриональных клеток, так же, как и нормальное развитие, требуют устойчивых клеточных контактов [3, 4]. Клетки взаимодействуют посредством секретируемых факторов роста, цитокинов, адгезивных молекул и «малых» медиаторов, таких как нуклеотиды или биоактивные липиды. Недавно было показано, что мембранные везикулы (membrane-derived vesicles, MV) играют важную роль во взаимодействии клеток. MV образуются на поверхности активированных клеток и содержат многочисленные белки и липиды этой клетки. Мембранные везикулы могут воздействовать на другие клетки через поверхностные лиганды [1, 5].

Ранее было показано, что культивирование зрелых соматических клеток с эмбриональными стволовыми (ES) или с их экстрактом вызывает репрограммирование ядра и эпигенетические изменения в дифференцированных клетках [6, 7]. Поддержание недифференцированного состояния, так же, как и индукция развития, управляются межклеточными взаимодействиями через молекулы мембран. Существует предположение, что эти изменения могут быть вызваны посредством мембранных везикул эмбриональных стволовых клеток (ES-MV) [6-8].

Ученые из University of Louisville (Louisville, KY, USA) выяснили, что эмбриональные стволовые клетки также содержат мембранные везикулы. Авторы исследования, опубликованного в журнале Leukemia, решили проверить гипотезу о возможной роли мембранных везикул, образующихся на поверхности эмбриональных стволовых клеток (ES-MV) и содержащих специфические «стволовые факторы», в репрограммировании ядра у прогениторных (или более дифференцированных) клеток.

В экспериментах на гемопоэтических клетках (HPC) они выяснили, что ES-MV, выделяющиеся в среду, повышают жизнеспособность и вызывают экспансию HPC, а также усиливают экспрессию ранних «стволовых» (Oct-4, Nanog и Rex-1) и гемопоэтических (Scl, HoxB4 и GATA 2) маркеров. Для этого гемопоэтические клетки Sca-1$^+$/kit$^+$/lin$^-$ (SKL) культивировали с факторами роста либо в среде с ES-MV. Как контроль использовали свежевыделенные SKL-клетки. В контроле способность клеток образовывать колонии через 5 дней резко снижалась. Добавление низкой концентрации ES-MV в среду способствовало поддержанию и даже увеличению количества колониеобразующих клеток. При большей концентрации ES-MV количество этих клеток возрастало в три раза. Таким образом, ES-MV не только защищают клетки от апоптоза, но и значительно увеличивают их количество. После теплового шока или обработки РНКазой эффект ES-MV прекращался, поэтому исследователи сделали вывод, что именно белки и мРНК несут главную функцию в этих структурах.

Факторы Wnt-3 и Oct-4 играют центральную роль в жизнедеятельности стволовых клеток и их поддержании в недифференцированном состоянии [9-11]. Авторы определили, что и крысиные и человеческие ES-MV богаты белком Wnt-3 и mRNA некоторых транскрипционных факторов, поддерживающих плюрипотентность (Oct-4, Rex-1, Nanog, SCL и GATA-2, -4). Их содержание было выше, чем даже в самих клетках-донорах ES-MV, что говорит о наличии какого-то механизма, обогащающего везикулы этими веществами.

Так как известно, что апоптотические тельца участвуют в горизонтальном переносе ДНК между клетками [12,13], а экстракты клеток индуцируют эпигенетические изменения в клетках [6, 8], ученые предположили, что ES-MV могут передавать свое содержимое нормальным соседним клеткам (физиологическая липофекция). Для проверки этой гипотезы, они подвергли воздействию ES-MV, наполненных lipid-fluorochrome PKH26, три типа клеток: ESC, клетки саркомы RH30, и крысиные SKL. После проникновения или слияния клеток с ES-MV, их содержимое можно было обнаружить внутри клеток. Такие же результаты были получены с человеческими CD34$^+$ клетками.

Ученые проверили, может ли мРНК, передаваемая ES-MV в клетки, транслироваться. Уже говорилось о том, что ES-MV содержат не только мРНК гена Oct-4, но и сам белок. Чтобы отличить трансляцию *de novo* от принесенного белка, был поставлен эксперимент с везикулами, обработанными РНКазой. Oct-4 не детектировался во свежевыделенных SKL-клетках, но после инкубации с ES-MV эти клетки начинали экспрессировать белок Oct-4. Содержание же этого белка при инкубации с ES-MV, обработанными РНКазой, резко снижалось. В то же время, содержание белка Oct-4 в везикулах не изменялось после обработки РНКазой. Все это подтверждает, что в клетках происходит трансляция Oct-4 с мРНК, принесенной ES-MV.

Таким образом, при слиянии с клетками-мишенями ES-MV могут доставлять мРНК в эти клетки, и тем самым индуцировать в них эктопическую экспрессию генов. Исследователи постулировали, что ES-MV могут увеличивать мультипотентность HPC благодаря горизонтальному переносу мРНК и белков из эмбриональных стволовых клеток. Можно предположить, что активация транскрипции факторов Oct-4, Nanog, Rex-1 и HoxB4 происходит из-за стимуляции клеток мембранными факторами, такими как Wnt3, и/или из-за передачи везикулами мРНК этих генов.

Далее ученые исследовали эффект ES-MV *in vivo*. Для этого те же клетки (то есть, выращенные с факторами роста или с добавлением ES-MV, а также свежевыделенные) пересаживали облученным мышам. Через 12 дней смотрели количество колоний, образующихся в селезенке. Эксперимент показал, что ES-MV не так увеличивают количество мононуклеарных клеток в перифетической крови, как факторы роста. Однако через 12 дней в селезенке образуется гораздо больше колоний, если на клетки воздействовали ES-MV. Из контрольной группы клеток колоний образовалось меньше всего. Таким образом, результаты сравнения показали, что при добавлении ES-MV индуцируется экспрессия специфических транскрипционных факторов и увеличивается количество колониеобразующих клеток. Эти данные могут говорить о том, что ES-MV стимулируют деление клеток и увеличивают их мультипотентость.

Эта работа продемонстрировала наличие нового механизма передачи информации и контроля развития между стволовыми и соседними клетками. Авторы подтвердили гипотезу о том, что MV, полученные от ESC (ES–MV), содержат различные, специфические для стволовых клеток молекулы, в том числе и трансмембранные, которые могут воздействовать на рост и развитие, а также поддерживать самообновление и «стволовость» окружающих клеток *in vitro.* ES–MV селективно обогащаются мРНК в процессе их формирования. ES–MV могут активировать клетки своими мембранными молекулами, а также передавать белки и РНК, индуцируя трансляцию. Эти наблюдения могут выявить новый механизм горизонтального переноса генетической информации между клетками, а также выявить те молекулы, которые лежат в основе биологического феномена репрограммирования ядра зрелой соматической клетки факторами овоцита при его переносе или слиянии. [6, 8,14].

Возможно, что такой перенос информации обеспечивает распространение трансгенов или малых интерферирующих РНК в соматических клетках. Также не исключено, что в этих везикулах обнаружатся малые ядерные РНК, которые наряду с белками играют роль факторов транскрипции. ES–MV имеют преимущества перед рекомбинантными факторами роста или цитокинами, так как лучше поддерживают плюрипотентное состояние клеток, вызывая экспрессию факторов транскрипции, поэтому MV могут стать хорошим средством поддержания стволовой клеточной линии. Сейчас еще не ясно, насколько транспорт молекул через MV распространен в клеточной биологии. Безусловно, необходимы дальнейшие исследования содержания РНК и белков в ES–MV, а также антигенов, которые могут вызвать иммунный ответ.

Ученые ожидают, что анализ белков ES–MV поможет найти такие молекулы, которые отличают клетки внутренней массы бластоцисты от будущего трофобласта, а также влияют на раннее развитие ES–клеток. Возможно, именно такие молекулы ответственны за поддержания «стволовости» или запуск дифференцировки.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Janowska–Wieczorek A., Majka M., Kijowski J. et al. Platelet–derived microparticles bind to hematopoietic stem/progenitor cells and enhance their engraftment. Blood 2001; 98(10): 3143–9.
2. Baj–Krzyworzeka M., Majka M., Pratico D. et al. Platelet–derived microparticles stimulate proliferation, survival, adhesion, and chemotaxis of hematopoietic cells. Exp. Hematol. 2002; 30(5): 450–9.
3. Parker M.A., Bell M.L., Barlow L.A. Cell contact–dependent mechanisms specify taste bud pattern during a critical period early in embryonic development. Dev. Dyn. 2004; 230(4): 630–42.
4. Cole F., Zhang W., Geyra A. et al. Positive regulation of myogenic bHLH factors and skeletal muscle development by the cell surface receptor CDO. Dev. Cell 2004; 7(6): 843–54.
5. Morel O., Toti F., Hugel B., Freyssinet J.M. Cellular microparticles: a disseminated storage pool of bioactive vascular effectors. Curr. Opin. Hematol. 2004; 11(3): 156–64.
6. Do J.T., Scholer H.R. Nuclei of embryonic stem cells reprogram somatic cells. Stem Cells 2004; 22(6): 941–9.
7. Cowan C.A., Atienza .J, Melton D.A., Eggan K. Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells. Science 2005; 309(5739): 1369–73.
8. Landsverk H.B., Hakelien A.M., Kuntziger T. et al. Reprogrammed gene expression in a somatic cell–free extract. EMBO Rep. 2002; 3(4): 384–9.
9. Sato N., Meijer L., Skaltsounis L. et al. Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK–3–specific inhibitor. Nat. Med. 2004; 10(1): 55–63.
10. Reya T., Duncan A.W., Ailles L. et al. A role for Wnt signalling in self–renewal of haematopoietic stem cells. Nature 2003; 423(6938): 409–14.
11. Niwa H, Miyazaki J., Smith A.G. Quantitative expression of Oct–3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self–renewal of ES cells. Nat. Genet. 2000; 24(4): 372–6.
12. Bergsmedh A., Szeles A., Henriksson M. et al. Horizontal transfer of oncogenes by uptake of apoptotic bodies. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2001; 98(11): 6407–11.
13. Holmgren L., Szeles A., Rajnavolgyi E. et al. Horizontal transfer of DNA by the uptake of apoptotic bodies. Blood 1999; 93(11): 3956–63.
14. Hakelien A.M., Landsverk H.B., Robl J.M. et al. Reprogramming fibroblasts to express T–cell functions using cell extracts. Nat. Biotechnol. 2002; 20(5): 460–6.

Подготовила Т.В. Лопатина
по материалам Leukemia 2006 Feb 2; Epub. doi: 10.1038/sj.leu.2404132

Управляемая экспансия гемопоэтических стволовых клеток *in vivo*

Экспансия (размножение) гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) – перспективное направление клеточной терапии и развития бизнеса, связанного с банкированием пуповинной крови. Все исследования, которые были опубликованы по этому вопросу, описывают различные способы экспансии ГСК *ex vivo* [1–6]. Основной целью экспансии ГСК *ex vivo* является получение их достаточного для трансплантации и реализации терапевтического эффекта количества при сохранении функциональных свойств (способность приживаться и поддерживать длительный гемопоэз) [1]. Основными направлениями решения этой задачи являются: 1) выбор оптимальной популяции ГСК для экспансии; 2) определение особенностей экспансии популяций ГСК, которые подвергаются энграфтингу; 3) обнаружение новых факторов (агентов), влияющих на деление ГСК *ex vivo* и *in vivo* [2].

Большинство протоколов экспансии ГСК *ex vivo* используют цитокины и факторы роста [1–4]. Недавно была описана группа так называемых ангиопоэтин–подобных белков (Angptl), синтезируемых клетками эмбриональной печени и способных повысить в количество ГСК в культуре 20–30 раз. Авторы предполагают, что Angptl активизируют сигнальные пути, отличные от тех через которые действуют известные гемопоэтические факторы – SCF, TPO, IGF–2 или FGF–1 [11]. Современные работы посвящены пониманию молекулярных механизмов, способных влиять на размножение ГСК [4,5]. Так, большое значение имело исследование Wnt–сигнального пути [5], активация которого через экспрессию гена HoxB4 способствует экспансии ГСК [6]. Неотъемлемым компонентом Wnt–механизма является её негативный регулятор – гликоген–синтаза–киназа–3 (GSK–3) [8] GSK–3 – ключевой фермент, вызывающий также модуляцию Notch–сигнального пути [9].