CD30 – биомаркер трансформированных стволовых клеток

Возможности применения производных эмбриональных стволовых клеток человека (чЭСК) в целях регенеративной медицины ставят серьезные задачи по контролю за качеством и безопасностью получаемых на их основе трансплантатов. Известно, что во время длительного культивирования в стволовых клетках происходят генетические аберрации (амплификации и делеции определенных участков, изменения паттерна метилирования промоторов протоонкогенов), приводящие к необратимым изменениям свойств чЭСК [1,2]. Такая трансформация несет большой риск канцерогенеза после трансплантации клеток и тканей, выделенных из линий ЭСК. Причины такой генетической нестабильности до сих пор неясны (многие ученые связывают ее с условиями культивирования), а существующие генетические методики хоть и являются достаточно точными, но подходят для анализа небольшого количества клеток.

Наиболее распространённым методом выявления генетической нестабильности длительно культивируемых стволовых клеток остаётся кариотипирование. К другим методам относится определение экспрессии онкогенов и проонкогенов (myc–, Ras–, Rho–). Однако эти методы обладают рядом недостатков или не могут полностью оценить возможные мутации. Например, при применении кариотипирования возможно определить лишь хромосомные аберрации, а качественная ПЦР способна показать активность конкретных генов. Поэтому выявление новых биомаркеров (или их группы), хорошо характеризующих генетическую нестабильность линии ЭСК или первичных длительно культивируемых стволовых клеток, значительно облегчило бы их анализ и позволило модифицировать культуральные методики для лучшего поддержания стабильности клеточного генома.

Австралийские исследователи из Monash University на роль такого маркера предложили поверхностный антиген CD30. Оказалось, что этот маркёр экспрессируется только на трансформированных, но не на нормальных чЭСК. Исследование опубликовано в журнале Nature Biotechnology.

CD30 относится к семейству рецепторов факторов некроза опухоли и обеспечивает защиту клеток от включения апоптотических путей (т.е. отвечает за их выживание). Первоначально молекула была обнаружена на клетках Рида-Штенберга (Reed–Stenberg cells) при Ходжкинской лимфоме [3]. Впоследствии этот рецептор был обнаружен на некоторых других типах клеток: активированных лимфоцитах, децидуальных клетках, клетках эмбриональной карциномы (ЭК) [4]. Поэтому авторы предположили, что маркер может присутствовать на человеческих ЭСК.

Авторы описывают также более короткую форму мРНК CD30 из клеток ЭК, кодирующую другую изоформу белка, представляющего собой лишь цитоплазматический домен рецептора. Было показано, что именно эта «урезанная» форма осуществляет постоянную активацию сигнального пути NF–κB в отсутствии лиганда (аутокринный механизм со взаимодействием с NF–κB–путем).

Экспрессию CD30 в клетках ЭК сравнивали с таковой в нормальных лимфоцитах. Оказалось, что экспрессия этого рецептора присуща лишь трансформированным клеткам. При использовании чЭСК в экспериментах по оценке экспрессии CD30, клетки культивировались при разных условиях – стандартное культивирование в присутствии сыворотки на мышином фидере (в этих условиях клетки поддерживали стабильный нормальный кариотип), культивирование в присутствии заменителя сыворотки, также на фидере по методике Amit et al. [5], или в присутствии кондиционированной среды от мышиных фибробластов. При замене сыворотки на ее аналог и бесфидерном культивировании кариотипически нормальные линии HES–1, HES–2, HES–3 изменялись, а трансформированные клетки быстро «переростали» нормальный диплоидный кариотип. Изменения представляли собой дупликацию части длинного плеча 1–й хромосомы, трисомию 12–й, и другие. Именно такие, кариотипически измененные клеточные линии, экспрессировали CD30 и его изоформу (обнаруженную в ЭК). Рецептор экспрессировался при всех аномалиях, но одновременное присутствие мутации и CD 30 было показано авторами лишь для трисомии 12–й хромосомы.

При культивировании в стандартных условиях (в присутствии сыворотки и на фидере), в течении того же промежутка времени, все нормальные диплоидные линии чЭСК были CD30–негативны. Авторы считают, что это может указывать на «неучастие» CD30 в нормальном эмбриогенезе. Они также показали, что CD30 обеспечивает лучшую выживаемость трансформированных клеток (тест на апоптоз), а также связь специфической изоформы CD30 с сигнальным путем NF–κB. Возможно, экспрессия CD30 связана с адаптивными реакциями или является быстрой ответной реакцией на стресс при генетических поломках.

Если гипотеза о том, что появление CD30 является сигналом, сопровождающим ответ на генетические поломки, подтвердятся последующими экспериментами, то этот маркёр может стать хорошим критерием для сепарации трансформированных ЭСК, образующихся в процессе длительного культивирования и пассирования, от нормальных. Такие работы являются важными для разработки безопасных протоколов клеточной трансплантации, связанных с применением стволовых клеток в медицине.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Draper J.S., Smith K., Gokhale P. et al., Recurrent gain of chromosomes 17q and 12 in cultured human embryonic stem cells. Nat. Biotechnol. 2004; 22: 53–4.
2. Maitra A., Arking D.E., Shivapurkar N. et al. Genomic alterations in cultured human embryonic stem cells. Nature Genetics 2005; 37: 1099–103.
3. Durkop H., Latza U., Hummel M. et al. Molecular cloning and expression of a new member of the nerve growth factor receptor family that is characteristics for Hodgkin"s disease. Cell 1992; 68: 421–7.
4. Pera M.F., Bennet W., Cerretti D.P. et al. Expression of CD30 and CD30 ligand in cultured cell lines from human germ–cell tumours. Lab. Invest. 1997; 76: 497–504.
5. Amit M., Carpenter M.K., Inokuma M.S. et al. Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. Dev. Biol. 2000; 227: 271–8.

Подготовила В.С. Мелихова
по материалам Nat. Biotechnol. 2006; 24: 351