Секретируемый транскрипционный фактор HOXB4 стимулирует дифференцировку эндотелия из ЭСК человека

М.А. Лагарькова[1], И.А. Муфазалов[2], П.Ю. Волчков[2], С.Л. Киселев[1]
[1]Институт общей генетики РАН, Москва
[2]Институт биологии гена РАН, Москва

Secreted transcription factor HOXB4 promotes human ESCs endothelial lineage

M.A. Lagarkova[1], I.A. Mufasalov[2], P.Yu. Voltchkov[2], S.L. Kiselyev[1]
[1]Vavilov Institute of General Genetics, RAS, Moscow
[2]Institute of Gene Biology, RAS, Moscow

Целью данного исследования было выяснить, влияет ли секретируемый транскрипционный фактор HOXB4 на дифференцировку ЭСК человека в эндотелий. HOXB4 – мультифункциональный транскрипционный фактор, способный индуцировать или подавлять апоптоз, стимулировать или репрессировать пролиферацию и дифференцировку клеток. Известна важная роль HOXB4 в регуляции гемопоэза. Для выяснения влияния HOXB4 на дифференцировку в эндотелий было проведено кокультивирование ЭСК человека со стромальными клетками линии OP9 и клетками линии OP9hoxb4, секретирующими транскрипционный фактор HOXB4–TAT. Проведенный иммуногистохимический анализ не выявил различие экспрессии клетками эндотелиальных маркеров в зависимости от используемого фидера, но маркеры зрелого эндотелия (CD105) и сосудоподобные структуры, растущие на фидере из OP9hoxB4, проявлялись быстрее, чем на фидере OP9. Таким образом, наши данные позволяют утверждать, что секретируемый HOXB4–TAT оказывает влияние на контролируемую дифференцировку эмбриональных стволовых клеток человека по эндотелиальному пути.

Ключевые слова: эндотелий, дифференцировка, ЭСК человека, HOXB4.

The effect of the transcription factor HOXB4 on differentiation abilities of human ESCs to endothelial lineage was the aim of the present study. HOXB4 is a multifunctional transcription factor inducing or inhibiting apoptosis, promoting or repressing cell proliferation and differentiation. HOXB4 plays an important role in development and hematopoesis. OP9 stromal cells or OP9hoxb4 cells secreting transcription factor HOXB4–TAT were co–cultured with human embryonic stem cells to induce endothelial differentiation. OP9hoxb4 feeder cells significantly promoted timing of endothelium maturation both on the level of immunological makers expression and functionally in comparison with OP9 feeder. Thus our data indicate that secreted HOXB4–TAT largely influence controlled differentiation of human ESCs to endothelial cells.

Key words: endothelium, differentiation, hESCs, HOXB4.

Введение

К настоящему времени получен целый ряд доказательств общего происхождения гематопоэтических и эндотелиальных клеток в процессе развития. Клетки–предшественники, потенциально способные образовывать гематопоэтические и эндотелиальные клетки, были идентифицированы *in vitro* на модели ЭСК мыши [1–3] и позже *in vivo* при изучении гаструляции мышиного эмбриона [4]. При дифференцировке ЭСК мыши было также показано, что клоногенные гематопоэтические предшественники могут происходить из VE–cadherin$^+$CD45$^-$ клеток эндотелиального типа [5]. Нами ведутся работы по прямой дифференцировке ЭСК человека в клетки эндотелия и разрабатываются методы селекции дифференцированных клеток. Используя коллаген IV и коллаген I в качестве матрикса, специальную среду и VEGF и bFGF в качестве ростовых факторов, нам удалось получить клеточные популяции, в которых эндотелиальные клетки составляют более 50% (статья готовится к печати). Известно, что на гематопоэтическую дифференцировку ЭСК значительное влияние оказывает кокультивирование с мышиными стромальными клетками, а также гиперэкспрессия транскрипционного фактора HOXB4 [6–8]. Учитывая общее происхождение гематопоэтических и эндотелиальных клеток, не исключено, что оба фактора могут существенным образом стимулировать процессы дифференцировки.

HOXB4 принадлежит к высококонсервативному семейству гомеобоксных транскрипционных факторов HOX, играющих важнейшую роль в морфогенезе многоклеточных организмов. HOX семейство характеризуется наличием высококонсервативного ДНК–связывающего домена; кластерным расположением генов в хромосомах; особым порядком внутри группы, отражающим пространственно–временную характеристику экспрессии в эмбриогенезе. HOXB4 – мультифункциональный транскрипционный фактор, способный индуцировать и подавлять апоптоз, стимулировать и репрессировать пролиферацию и дифференцировку клеток. В эмбриогенезе HOXB4 участвует в развитии эпидермиса, нервной и скелетной систем [6]. Особая роль принадлежит HOXB4 в регуляции гематопоэза млекопитающих. Эктопическая экспрессия HOXB4 в стволовых клетках крови мыши приводит к более чем 1000–кратному увеличению числа поликлональных гематопоэтических предшественников, преимущественно лимфоидного и миелоидного ряда, без признаков трансформации клеток [7].

Экспрессия HoxB4 в человеческом костном мозге и в пуповинной крови усиливает репопуляционную способность гематопоэтических стволовых клеток, не усиливает их дифференцировку и не индуцирует лейкемию [9]. Нокаут HoxB4 приводит к уменьшению клеток в гематопоэтических органах и уменьшению количества гематопоэтических предшественников у мышей [10]. Однако, используя лентивирусную

экспрессию HoxB4 в гематопоэтических клетках, полученных из человеческих ЭСК, не удалось увеличить время жизни таких клеток при подсадке иммунодефицитным мышам [11]. В линии ЭСК человека, стабильно экспрессирующей HOXB4, клетки можно поддерживать в недифференцированном состоянии, а при дифференцировке с образованием эмбриоидных телец наблюдается преимущественная дифференцировка в гематопоэтические клетки [12]. Недавно был показан дозо-зависимый эффект действия HOXB4 на пролиферацию гематопоэтических клеток [13].

Целью данного исследования было выяснить, влияет ли секретируемый транскрипционный фактор HOXB4 на дифференцировку ЭСК человека в эндотелий.

Предпосылкой к исследованию послужил ряд опубликованных данных о стимулирующем влиянии HoxB4 на дифференцировку гематопоэтических клеток, а также наблюдения проф. А.Я. Медвинского о стимулирующей роли HOXB4 при эндотелиальной дифференцировке $CD45^{-}FLK1^{+}$ клеток из AGM (aorta-gonad-mesonephros) эмбрионов мыши (неопубликованные данные).

Для изучения роли HOXB4 в дифференцировке ЭСК человека мы сравнили дифференцировку ЭСК человека при культивировании на двух разных фидерах. Первый фидер представлял собой линию стромальных фибробластов мыши OP9. В научной литературе имеются многочисленные сведения об увеличении количества и скорости дифференцировки клеток крови при кокультивировании с этой линией стволовых клеток крови, клеток, обладающих свойствами гемангиобласта и эмбриональных стволовых клеток мыши и человека [8, 14, 15]. OP-9 также поддерживает пролиферацию и дифференцировку эндотелиальных $FLk1^{+}$ предшественников, происходящих из ЭСК мыши [16].

Вторым фидером служили клетки OP9-HoxB4. Это линия клеток на основе линии OP9, стабильно экспрессирующая секретируемый HoxB4 с TAT (transduction domain of HIV transactivating protein) для транслокации в ядро.

Материал и методы

В работе использовались клеточные линии эмбриональных стволовых клеток человека ESM02 и ESM03 [17] с 25 по 41 пассаж, культивирование происходило в следующих условиях: Knockout DMEM (Invitrogen), 20% фетальная бычья сыворотка (Invitrogen, ES qualified), 2 мМ L-глутамин (Invitrogen), 0.1 мМ β-меркаптоэтанол (Sigma), 1% смесь аминокислот (Invitrogen), рекомбинантный bFGF (4 нг/ml) (Chemicon), пенициллин/стрептомицин (50 ЕД/мл; 50 мкг/мл) (Invitrogen) при 37°C и 5% CO_2 на фидерном слое МЭФ, инактивированных митомицином С в желатинизированных 35 мм культуральных чашках Петри (Corning и Greiner). Клеточные линии OP9, OP9hoxB4 (получены в RIKEN Center for Developmental Biology, Япония) и первичные инактивированные мышиные эмбриональные фибробласты (МЭФ) культивировались в среде α-MEM, 20% фетальная бычья сыворотка, пенициллин/стрептомицин (50 ЕД/мл; 50 мкг/мл), 2 мМ L-глутамин (Invitrogen).

Для индукции эндотелиальной дифференцировки колонии недифференцированных ЭСК снимали механической диссекцией (как описано выше) и переносили на чашки Петри, покрытые коллагеном IV типа (Sigma) в среду, содержащую DMEM/F12 (HyClone), 15% фетальной бычей сыворотки (HyClone, characterized), 1% смесь аминокислот (Invitrogen), пенициллин/стрептомицин (50 ЕД/мл; 50 мкг/мл) (Invitrogen), рекомбинантный bFGF (4 нг/мл), SCF (20 нг/мл) – VEGF от 10 до 25 нг/мл (Chemicon).

Для иммуногистохимического анализа эмбриональных стволовых клеток и эмбриоидных телец использовались следующие антитела: первичные (anti-human CD31, anti-human vWF, anti-human CD105 (BD)) и вторичные (goat anti-mouse Alexa Fluor 488 или 546 Ig (Molecular Probes)).

Результаты и их обсуждение

При использовании OP9hoxB4 и OP9 для индукции эндотелиальной дифференцировки клетки высевали в плотности около 50% монослоя в одинаковые 6-луночные планшеты. После прикрепления OP9hoxB4 и OP9 на них высевали колонии ЭСК человека, предварительно освобожденные с помощью коллагеназы от фидера МЭФ. Культивирование проводилось в течение 5-10 дней в среде для дифференцировки эндотелия с меньшим (5 нг/мл) содержанием всех ростовых факторов. Состояние клеток и степень их дифференцировки оценивались через 7 дней по следующим параметрам: количество клеток в колонии; морфология клеток в колонии; диаметр колонии; количество эндотелиальных клеток и степень их дифференцировки.

Число клеток в колонии оценивалось следующим образом: по 20 колоний с каждого из фидеров снимали механически наконечником от пипетки, промывали дважды PBS и инкубировали 15 минут в нагретом до 37°C 0,05% трипсине, после чего инактивировали последний добавлением FBS. Клетки центрифугировали, разбавляли в 500 мкл среды DMEM и подсчитывали в камере Горяева.

К сожалению, нам не удалось получить статистически достоверных данных о том, есть ли разница в общем количестве клеток в колониях, растущих на OP9hoxB4 и OP9. Это можно объяснить и объективными, и субъективными факторами: клетки в колонии после 7 дней дифференцировки находятся в разных ее стадиях, популяция гетерогенна и имеет разную чувствительность к трипсину. В то время как одни группы клеток еще не успевают распасться на одиночные, другие «перетрипсиниваются» и слипаются в конгломераты. Подсчет, таким образом, затруднен, и мы решили,

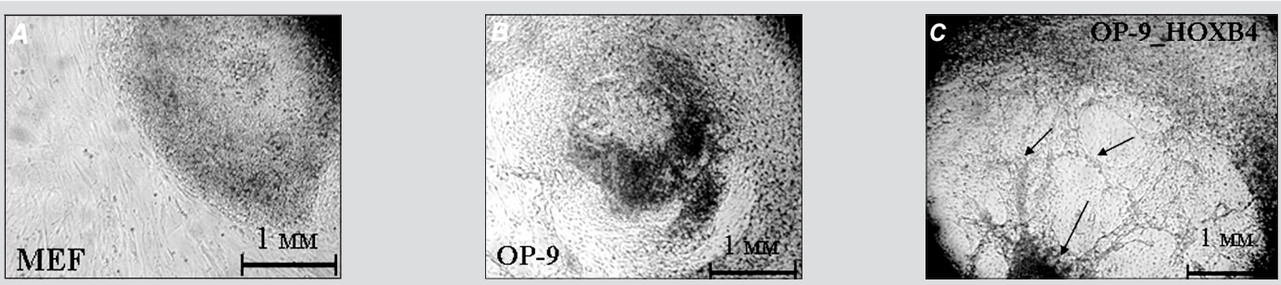

Рис. 1. Морфология колоний ЭСК человека линии ESM02 на 10 день культивирования на различных фидерах: A – колонии ЭСК на фидере из МЭФ; B – колонии ЭСК на фидере из OP9; C – колонии ЭСК на фидере из OP9hoxB4 Стрелками указаны сосудистоподобные структуры

что он не может считаться достоверным. Другой способ подсчета – окрашивание фиксированных колоний DAPI также не дал обнадеживающих результатов, потому что колонии – структура многослойная, и ядра часто заслоняют друг друга, делая подсчет практически невозможным.

Тем не менее, на фидерах OP9hoxB4 и OP9 колонии имели явные различия в морфологии и размере (рис. 1). Поскольку колонии вырастали достаточно большие, хорошо видные невооруженным глазом, для определения размера применялась как микроскопия (соотнесение увеличения объектива с размером объекта в светлом поле), так и простое измерение линейкой (фиксированную в метаноле чашку с колониями переворачивали, отмечали тонким фломастером границы колонии и измеряли диаметр). Измерения показали, что кокультивирование ЭСК с OP9 и OP9hoxB4 ведет к существенному увеличению размера колоний уже после трех дней кокультивирования (рис. 2). Морфология дифференцированных ЭСК на двух фидерах также отличалась: в колониях, которые росли на OP9hoxB4, было больше структур, подобных сосудистой сети (указаны стрелками на рис. 1, б) и больше клеток, имеющих более высокий статус дифференцировки (меньшее соотношение ядро/цитоплазма, больший размер и др. характеристики).

Для того чтобы определить, как повлияло культивирование на разных фидерах на дифференцировку эндотелия из ЭСК, был проведен иммуногистохимический анализ колоний на 8–10-й день культивирования. Проведенный иммуногистохимический анализ выявил различие в экспрессии клетками эндотелиальных маркеров в зависимости от используемого фидера. Уровень экспрессии CD31 и vWF и сложность сетчатых структур были выше в клетках, растущих на фидере из OP9hoxB4, чем на OP9. Более того, на 9-й день кокультивирования поздний эндотелиальный маркер CD105 обнаруживался только в клетках, подвергавшихся влиянию HOXB4 (рис. 3).

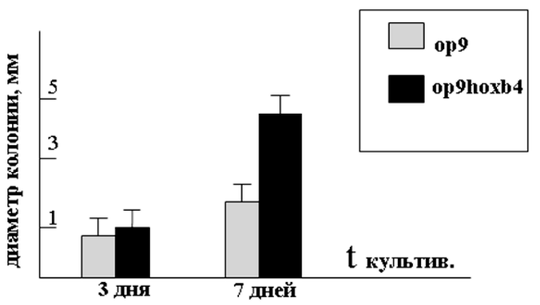

Рис. 2. Зависимость диаметра дифференцирующейся колонии ЭСК от используемого фидера: OP9 либо OP9hoxB4.

Под действием HOXB4 наблюдалась активная миграция сосудистоподобных структур за границу колонии, что подтверждается иммуногистохимическим анализом (рис. 4) Подобной миграции в колониях, растущих на OP9, на том же сроке дифференцировки (10 дней) мы не наблюдали.

Таким образом, наши данные позволяют утверждать, что секретируемый фидерными клетками транскрипционный фактор HOXB4, слитый с TAT белком, оказывает влияние на скорость и степень дифференцировки ЭСК человека по эндотелиальному пути. Механизмы подобного стимулирующего действия, а также увеличивает ли HOXB4 число эндотелиальных предшественников при дифференцировке ЭСК человека, остается пока неизвестным. Следует также отметить, что в данной работе мы сконцентрировали усилия на изучении эндотелиальной дифференцировки ЭСК человека и использовали среды, которые не способствуют дифференцировке ЭСК по пути гематопоэза. Например, в средах отсутствовали интерлейкин-3 и GM-CSF, обязательные для гематопоэтических дифференцировок. Вопрос о том, влияет ли HOXB4 на увеличение популяции гемангиобластов в дифференцирующихся ЭСК и/или на сдвиг дифференцировки гемангиобласта в сторону кроветворных или эндотелиальных предшественников, остается открытым.

Мы не можем исключить возможности не прямого, а опосредованного воздействия HOXB4 на дифференцировку ЭСК человека в эндотелий. Существует вероятность, что HOXB4 оказывает влияние на саму линию OP9, а она, в свою очередь, секретирует в среду факторы, стимулирующие дифференцировку ЭСК. Создание контрольной линии OP9, трансфицированной плазмидой, содержащей HOXB4 без TAT элемента, который бы не секретировался во внешнюю среду, позволит в будущем прояснить этот вопрос.

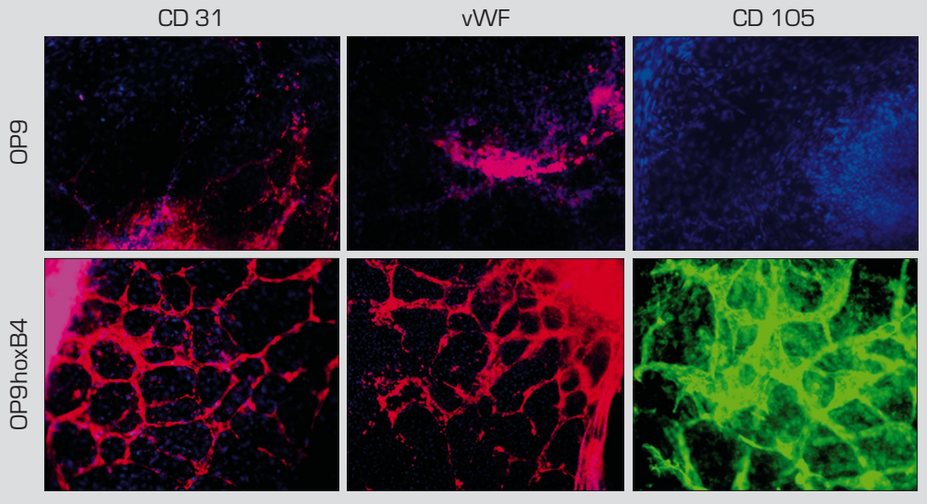

Рис. 3. Иммуногистохимический анализ ЭСК после 10 дней кокультивирования с OP9 и OP9hoxB4. Экспрессия эндотелиальных маркеров CD31 (красный), vWF(красный), CD105 (зеленый), ядра окрашены DAPI (синий). Вторичные антитела Alexa Fluor 546 (красный) и Alexa Fluor 488 (зеленый)

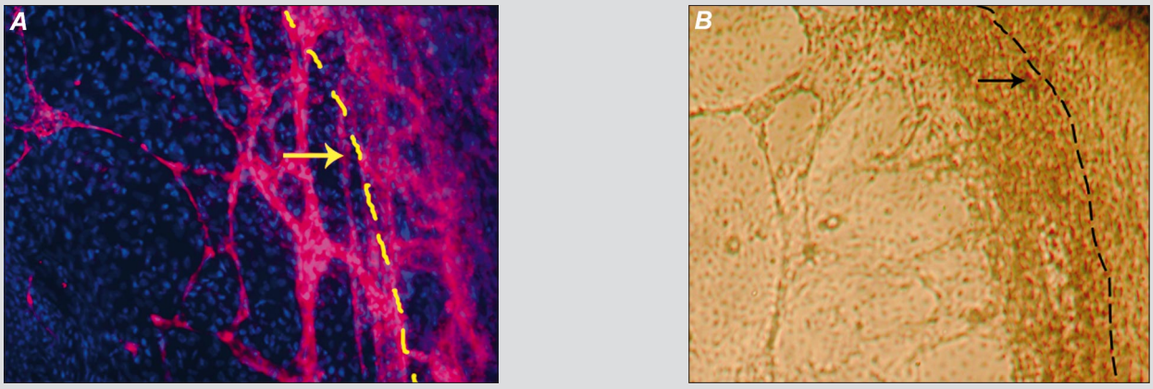

Рис. 4. Распространение сосудистоподобных структур за границу колонии на фидере из OP9hoxB4 на 10 день культивирования. Стрелка и пунктирная линия указывают на границу колонии:
A – Экспрессия эндотелиального маркера CD31 (красный), ядра окрашены DAPI (синий). Вторичные антитела Alexa Fluor 546;
B – фотография той же колонии в светлом поле

Благодарности:

Мы благодарим проф. А.Л. Медвинского и доктора Хирофуми Ину за предоставление клеточной линии OP9hoxB4. Благодарим проф. А.Л. Медвинского за то, что он поделился с нами своими предварительными наблюдениями о влиянии HOXB4 на эндотелиальную дифференцировку в AGM эмбрионов мыши.

Работа финансировалась из грантов РФФИ 05–04–49310–а ипрограммы «Молекулярная и клеточная биология» Президиума РАН.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Choi K., Kennedy M., Kazarov A. et al. A common precursor for hematopoietic and endothelial cells. Development 1998; 125(4): 725–32.

2. Chung Y.S., Zhang W.J., Arentson E. et al. Lineage analysis of the hemangioblast as defined by FLK1 and SCL expression. Development 2002; 129(23): 5511–20.

3. Nishikawa S.I., Nishikawa S., Hirashima M. et al. Progressive lineage analysis by cell sorting and culture identifies FLK1$^+$VEcadherin$^+$ cells at a diverging point of endothelial and hemopoietic lineages. Development 1998; 125(9): 1747–57.

4. Huber T.L., Kouskoff V., Fehling H.J. et al. Haemangioblast commitment is initiated in the primitive streak of the mouse embryo. Nature 2004; 432(7017): 625–30.

5. Fujimoto T., Ogawa M., Minegishi N. et al. Step–wise divergence of primitive and definitive haematopoietic and endothelial cell lineages during embryonic stem cell differentiation. Genes Cells 2001; 6: 1113–27.

6. Morgan R., Pettengell R., Sohal J. The double life of HOXB4. FEBS Lett. 2004; 578(1–2): 1–4.

7. Antonchuk J., Sauvageau G., Humphries R.K. HOXB4–induced expansion of adult hematopoietic stem cells ex vivo. Cell 2002; 109(1): 39–45.

8. Vodyanik M.A., Bork J.A., Thomson J.A., Slukvin I.I. Human embryonic stem cell–derived CD34+ cells: efficient production in the coculture with OP9 stromal cells and analysis of lymphohematopoietic potential. Blood 2005; 105(2): 617–26.

9. Sauvageau G., Thorsteinsdottir U., Eaves C.J. et al. Overexpression of HOXB4 in hematopoietic cells causes the selective expansion of more primitive populations in vitro and in vivo. Genes Dev. 1995; 9(14): 1753–65.

10. Brun A.C., Bjornsson J.M., Magnusson M. et al. HOXB4–deficient mice undergo normal hematopoietic development but exhibit a mild proliferation defect in hematopoietic stem cells. Blood 2004; 103: 4126–33.

11. Wang L., Menendez P., Shojaei F. et al., Generation of hematopoietic repopulating cells from human embryonic stem cells independent of ectopic HOXB4 expression. J. Exp. Med. 2005; 201(10): 1603–14.

12. Bowles K.M., Vallier L., Smith J.R. et al., HOXB4 overexpression promotes hematopoietic development by human embryonic stem cells. Stem Cells 2006; 24(5): 1359–69.

13. Will E., Speidel D., Wang Z. et al. HOXB4 inhibits cell growth in a dose–dependent manner and sensitizes cells towards extrinsic cues. Cell Cycle 2006; 5(1): 14–22.

14. Nakano T., Kodama H., Honjo T. Generation of lymphohematopoietic cells from embryonic stem cells in culture. Science 1994; 265(5175): 1098–101.

15. Nakano T., Kodama H., Honjo T. In vitro development of primitive and definitive erythrocytes from different precursors. Science 1996; 272(5262): 722–4.

16. Hirashima M., Kataoka H., Nishikawa S. et al. Maturation of embryonic stem cells into endothelial cells in an in vitro model of vasculogenesis. Blood 1999; 93(4): 1253–63.

17.. Lagarkova M.A, Volchkov P.Y., Lyakisheva A.V. et al. Diverse epigenetic profile of novel human embryonic stem cell lines. Cell Cycle 2006; 5: 416–20.