ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Двойной негативный эпигенетический контроль генов, вовлеченных в регуляцию дифференцировки ЭСК человека в эндотелий

П.Ю. Волчков[1,2], М.А. Лагарькова[1], М.А. Прохорович [3], С.Л. Киселев[1]

[1] Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН,
[2] Институт биологии гена РАН,
[3] Институт цитологии и генетики СО РАН

Double negative epigenetics regulation of genes in differentiation of human endothelial stem cells into endothelium

P.Yu. Volchkov[1,2], M.A. Lagarkova[1], M.A. Prokhorovich [3], S.L. Kiselyev[1]

[1] Vavilov Institute of General Genetics, RAS,
[2] Institute of Gene Biology, RAS,
[3] Institute of Genetics and Cytology, Siberian branch of RAS

Сосудистый эндотелий является одним из первых дифференцированных видов клеток, которые появляются в раннем эмбриогенезе. Во взрослом организме сосудистый эндотелий играет важную роль в регуляции гомеостаза кровеносных сосудов и отделяет компоненты крови от остальных тканей организма. Эндотелий характеризуется экспрессией определенного набора генов, среди которых транскрипционные факторы GATA–2, –3 и контролируемый ими специфический для сосудистого эндотелия ген eNOS. Большой вклад в контроль работы генов, особенно на этапах раннего развития, дают эпигенетические механизмы. Используя разработанную нами ранее модель контролируемой дифференцировки ЭСК человека в функциональный эндотелий, мы исследовали вклад метилирования промоторных областей генов eNOS, GATA–2 и GATA–3 в регуляцию экспрессии этих генов. Полученные данные показали, что гиперметилирование промоторных областей генов транскрипционного фактора GATA–2 и контролируемого им гена eNOS в недифференцированных ЭСК человека блокирует их экспрессию. В эндотелиальных клетках, полученных из ЭСК, и в HUVEC эти области гипометилированы и гены экспрессируются. Таким образом, нами показано, что в ЭСК осуществляется двойной негативный контроль одного из путей дифференцировки клеток и для разработки схем направленной дифференцировки ЭСК важно знать и контролировать эпигенетический статус генома клеток.

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

There are a number of genes which expression is characteristic for endothelium. Transcription factors GATA–2 and –3, endothelial NO synthitase (eNOS) are among them. During early embryogenesis epigenetics mechanisms of gene regulation plays an important role. Human embryonic stem cells (hESCs) represent a valuable model to study early embryogenesis events. Using the previously developed model of hESCs differentiation to functional endothelium we compared status of GATA–2, GATA–3 and eNOS gene's promoters methylation in hESCs, hESCs–derived purified endothelial cells and human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). Hypermethylation of promoter regions of genes studied in hESCs correlates with gene silencing whereas hypomethylation in hESCs–derived endothelial cells and HUVECs correlated with the high level of expression. Overall our data indicate the importance of epigenetic regulation for tissue–specific differentiation and provide the evidence that in the course of in vitro differentiation ESCs undergo the same epigenetic program as differentiating cells of embryo in vivo.

Key words: epigenetics, endothelial stem cells (ESCs), differentiation, endothelium.

Введение

Сосудистые эндотелиоциты являются одними из первых дифференцированных видов клеток, которые появляются в раннем эмбриогенезе. Развитие эндотелиоцитов тесно связано с развитием гемопоэтических клеток. Эти два клеточных типа первыми дифференцируются из мезодермального зародышевого листка, после миграции в желточный мешок. Согласно общепризнанной гипотезе [1], клетки формируют агрегаты гемангиобластов на границе зародышевой и внезародышевой тканей. Далее созревание идет в кровяных островках, центральные клетки становятся клетками крови, а периферические – эндотелиальными.

Эндотелий – высокоспециализированная, метаболически активная ткань, выстилающая внутреннюю поверхность кровеносных сосудов, которая играет важную роль в поддержании гомеостаза сосудов с помощью производимых эндотелием факторов. Эндотелий выделяет ряд вазоактивных медиаторов, например, простоциклин, оксид азота, эндотелиальный гиперполяризационный фактор (EDHF), которые влияют не только на развитие и тонус гладкомышечного слоя сосудов, но и на проницаемость сосудов, а также регулируют циркуляцию лейкоцитов, эритроцитов и тромбоцитов [2].

Эмбриональные стволовые клетки (ЭСК), обладающие способностью к дифференцировке в различные клеточные типы, представляют собой уникальную модель, используя которую на одной нетрансформированной клеточной линии можно изучать клеточные и молекулярные механизмы

раннего эмбриогенеза и дифференцировки, а также иметь стандартные модели нормальных терминально дифференцированных клеточных типов. Необходимо отметить, что практически все исследования по экспрессии генов выполняются либо на трансформированных клеточных линиях, либо на первичных клетках различных особей. И то и другое может приводить к получению некорректных результатов. В случае использования разработанных моделей направленной дифференцировки ЭСК в желаемый цитофенотип мы полностью исключаем возможный вклад трансформированного генома и имеем абсолютную воспроизводимость результатов, поскольку избегаем использования первичных тканевых культур от разных особей и организмов.

Формирование эндотелия в эмбриогенезе и его функционирование во взрослом организме сопровождается экспрессией целого ряда транскрипционных факторов. Семейство GATA состоит из 6 транскрипционных факторов, из которых GATA–2, –3 и –6 экспрессируются в эндотелии [3]. Первоначально считали, что GATA факторы участвуют лишь в дифференцировке [4], однако, в недавних исследованиях было показано, что GATA факторы принимают непосредственное участие в реорганизации внеклеточного окружения дифференцированных эндотелиальных клеток, регулируя экспрессию своих генов–мишеней [5]. Кроме непосредственного связывания со своими сайтами, GATA факторы могут связываться с различными транскрипционными факторами и кофакторами, участвуя в образовании сложных транскрипционных комплексов.

GATA–2 экспрессируется в различных типах тканей и играет важную роль в образовании гемопоэтических предшественников [6], урогенитального тракта, образовании специфических нейронов V2 в спинном мозге. В процессе дифференцировки и в дифференцированных эндотелиальных клетках GATA–2 регулирует экспрессию таких генов, как eNOS [7] эндотелин–1, Flk–1, ICAM–2, P–селектин, PECAM–1, Utrophin–B, vWF.

GATA–3 экспрессируется во многих тканях мышиного эмбриона [8]. Как GATA–1 и –2, GATA–3 принято относить к гемопоэтическим транскрипционным факторам [9, 10]. В работе S. Levenberg и соавт. [11] показано, что GATA–3 экспрессируется в недифференцированных эмбриональных стволовых клетках (ЭСК) на очень низком уровне. По мере дифференцировки ЭСК в эмбриоидные тельца увеличение уровня экспрессии GATA–3 происходит вплоть до 6 дня дифференцировки, а затем экспрессия уменьшается. В работах тех же авторов был продемонстрирован высокий уровень экспрессии этого гена в HUVEC (human umbilical vien endothelial cells). Роль GATA–3 в гистогенезе и дифференцировке эндотелия мало изучена. GATA–3 принимает участие в позитивной регуляции экспрессии гена VCAM–1, а GATA–6 негативно регулирует тот же ген. Одни GATA факторы регулируют экспрессию других. Например, GATA–1 принимает участие в регуляции экспрессии GATA–2 [12], а GATA–2 регулирует экспрессию GATA–3 [13]. Тем самым, образуется сложная сеть регуляции экспрессии, которая отражается на фенотипе клеток.

Эти и другие транскрипционные факторы оказывают влияние на экспрессию генов, специфических для эндотелия. Одним из наиболее характерных эндотелиальных генов является eNOS [14]. eNOS производит основную часть оксида азота, который участвует в противовоспалительных процессах, регуляции адгезии тромбоцитов к стенкам кровеносных сосудов, а также ингибирует пролиферацию клеток гладкой мускулатуры сосудов. eNOS экспрессируется на поздних стадиях дифференцировки эндотелия и характеризует зрелый эндотелий [14].

Для eNOS была показана зависимость экспрессии от эпигенетического статуса его регуляторных областей в эндотелиальных и неэндотелиальных клетках [15]. Для транскрипционных факторов GATA–2 и GATA–3 такие исследования не проводились. В данной работе мы исследовали метилирование промоторных областей генов eNOS, GATA–2 и GATA–3 во время тканеспецифической дифференцировки ЭСК человека в клетки функционального эндотелия, для чего использовали разработанную ранее в нашей лаборатории модель дифференцировки и селекции эндотелия из ЭСК человека.

Материал и методы

Клеточные линии

В работе использовались клеточная линия ЭСК человека ESMO3 (46XX) [16], первичные эндотелиоциты пупочной вены (HUVEC) (46XX), предоставленные лабораторией П. Лактионова (ИХБиФМ, Новосибирск), и первичные инактивированные мышиные эмбриональные фибробласты (МЭФ).

Культивирование ЭСК человека и дифференцировка клеток эндотелия

Среда для культивирования ЭСК человека имела следующий состав: Knockout DMEM (Invitrogen), 20% ES Serum Replacement (Invitrogen), 2 мМ L–глутамин (Invitrogen), 0,1 мМ β–меркаптоэтанол (Sigma), 1% смесь заменимых аминокислот (Invitrogen), рекомбинантный bFGF (4 нг/мл) (Chemicon), пенициллин/стрептомицин (50 ЕД/мл; 50 мкг/мл) (Hyclone).

Эмбриональные стволовые клетки культивировали при 37°С и 5% CO_2 на фидерном слое МЭФ, инактивированных митомицином С в желатинизированных культуральных чашках Петри диаметром 35 мм (Corning и Greiner). Клетки пассировали каждые 5–6 дней культивирования механической диссекцией или обработкой 0,05% трипсином. Дифференцировка ЭСК человека в клетки эндотелия осуществлялась как описано в работе M. Lagarkova et al. (in press).

Иммуномагнитная сепарация клеток

Для выделения $CD31^+$ клеток, колонии, растущие на чашках, покрытых коллагеном IV типа на 5 день дифференцировки диссоциировали обработкой 0,05% трипсин/ЭДТА (Hyclone) при 37°С в течение 10 мин. После инактивации трипсина сывороткой клетки дважды промывали PBS, содержащим 0,5% BSA, инкубировали 30 мин с мышиными антителами против CD31 человека (BD) и затем с IgG козы против мыши, связанными с магнитными шариками (Miltenyi Biotec) в течение 15 мин при 8°С. После каждого этапа клетки дважды промывали PBS, содержащим 0,5% BSA. Для получения фракции CD31–позитивных клеток производили элюцию на колонке (Miltenyi Biotec), прикрепленной к магнитному блоку Mini–MACS separation unit (Miltenyi Biotech), согласно рекомендациям производителя.

ОТ–ПЦР анализ

Для выделения тотальной РНК из клеточных культур использовали колонки MiniRNA kit (Qiagen) согласно прилагающимся инструкциям. Обработка ДНКазой–I осуществлялась непосредственно на колонках с использованием прилагающегося к набору MiniRNA kit ДНКазы–I и буфера. Реакцию обратной транскрипции проводили с использованием RevertAid M–MuLV Reverse Transcriptase (Fermentas) согласно прилагающимся инструкциям. Для проведения ПЦР–амплификации использовали Taq полимеразу (Fermentas). Последовательности праймеров (НПФ «Синтол») для ОТ–ПЦР указанны в табл. 1.

Таблица 1. **Последовательности праймеров для ОТ–ПЦР**

Название гена	Последовательность праймеров
GATA-2	5'CCCTAAGCAGCGCAGCAAGAC3' 5'TGACTTCTCCTGCATGCACT3'
GATA-3	5'TCACAAAATGAACGGACAGAAC3' 5'GGGTTAAACGAGCTGTTCTTG3'
eNOS	5"GTGATGGCGAAGCGAGTGAAG3' 5"CCGAGCCCGAACACACAGAAC3'

Геномное бисульфитное секвенирование

Для выделения геномной ДНК клетки суспендировали в 0,7 мл буфера, содержащего 100 мМ NaCl, 10 мМ Tris–HCl pH 8,0, 25 мМ EDTA pH 8,0, 0,5% SDS и 0,1 мг/мл протеиназы К. Обработку протеиназой К осуществляли в течение ночи при 56°С. ДНК экстрагировали равным объемом фенола/хлороформа, затем равным объемом хлороформа и преципитировали 1/12 объема 7,5 М ацетата аммония, 2,5 объемами этанола. После двукратной промывки в 70% этаноле ДНК ресуспендировали в буфере ТЕ в концентрации 0,2 мг/мл. Геномная ДНК была подвергнута бисульфитной модификации в соответствии с инструкциями, прилагающимися к киту для бисульфитной модификации ДНК (CpGenome Fast DNA Modification Kit, Chemicon). Аликвоты ДНК, модифицированной бисульфитом натрия, были использованы для ПЦР при 45 циклах амплификации. Праймеры для ПЦР были подобраны к промоторным районам генов eNOS, GATA–2, GATA–3, соответствующие модифицированной бисульфитом матрице (табл. 2). Продукты ПЦР были субклонированы в вектор pGEM с помощью набора pGEM–T Easy (Promega). 10 субклонов каждого продукта ПЦР были секвенированы.

Таблица 2. **Последовательности праймеров для бисульфитного секвенирования**

Название гена	Последовательность праймеров	Положение праймеров относительно старта транскрипции
eNOS	5'TGATTTTTTGGTGGTTTTATTTTGTT3' 5'CTCTTCAAATTACCCATATTACTAT3'	–321 37
GATA-2	5'AgtgtggatgTaTagggtgtg3' 5'acaaacaataaacaaacttaaacaa3'	–217 67
GATA-3	5'GATGATATTAGAAATTTTTTTAAGTTG3' 5'AATCCTCCCAAATAATTAAAAACAA3'	–139 252

Результаты и обсуждение

Анализ экспрессии GATA–2 при дифференцировке ЭСК человека в клетки эндотелия показал, что GATA–2 экспрессируется в клетках эндотелия из ЭСК на том же уровне, что и в HUVEC, и не экспрессируется в недифференцированных ЭСК человека (рис. 1). На сегодняшний день механизмы, участвующие в регуляции экспрессии транскрипционного фактора GATA–2, остаются еще мало изученными. Однако, известно, что на ранней стадии эмбрионального развития происходят кардинальные изменения эпигенетического статуса генома [17]. В то же время нами было показано, что некоторые гены экспрессируются в дифференцирующихся ЭСК человека вне зависимости от статуса метилирования промоторных районов [16]. Считается, что экспрессия транскрипционного фактора GATA–2 характерна для раннего гемангиобласта [18]. До настоящего времени не известен возможный вклад эпигенетического состояния промоторного района GATA–2 в процессы регуляции дифференцировки ЭСК человека. Поэтому мы решили проанализировать паттерн метилирования промоторного района GATA–2 в ЭСК человека, не экспрессирующих GATA–2 и в клетках эндотелия, полученных из ЭСК человека, и в HUVEC, экспрессирующих GATA–2. Для этого в изучение были взяты недифференцированные ЭСК человека и чистая популяция клеток эндотелия, полученная из ЭСК человека с помощью иммуномагнитной сепарации (рис. 2). В качестве контроля использовали человеческие эндотелиальные клетки из пупочной вены (HUVEC) третьего–четвертого пассажей.

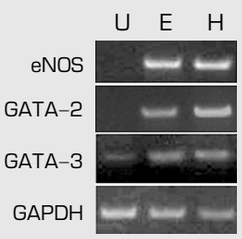

Рис. 1. ОТ–ПЦР анализ экспрессии генов eNOS, GATA–2, GATA–3, GAPDH в недифференцированных ЭСК линии ESMO3 (U), клетках эндотелия из ЭСК линии ESMO3, полученных с помощью иммуномагнитной сепарации (E) и в клетках эндотелия из пупочной вены (H) человека

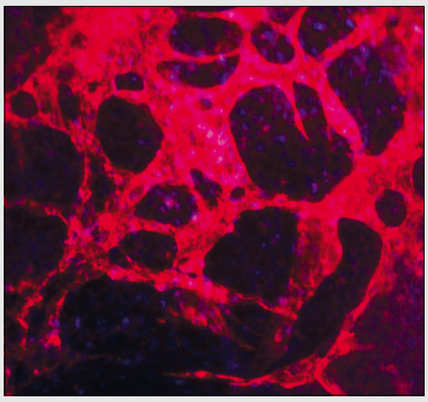

Рис. 2. Иммуноцитохимическое окрашивание клеток эндотелия из ЭСК человека антителами против CD31 (красный). Ядра окрашены DAPI (синий). × 10

Как и другие GATA гены, GATA–2 гены млекопитающих экспрессируются с двух альтернативных промоторов – селективного и главного. Селективный промотор активен в гемопоэтических клетках, а главный – во всех остальных типах тканей, где экспрессируется GATA–2. Селективный промотор расположен примерно на 5 т.п.н. ближе к 5' концу гена GATA–2 [9]. Было решено проанализировать особенно насыщенную CpG динуклеотидами область, соответствующую селективному промотору гена GATA–2, экспрессия с которого осуществляется в гемопоэтических клетках. Для анализа статуса метилирования было выбрано бисульфитное секвенирование, так как оно обеспечивает высокое разрешение и не требует значительного количества образца ДНК. Были выбраны праймеры на значимую цепь, на область с 43 по –187 нуклеотид относительно старта транскрипции. При бисульфитной модификации ДНК неметилированные цитозиновые основания модифицируются так, что Taq полимераза воспринимает их как тиминовые, а метилированные цитозиновые по–прежнему воспринимаются как цитозиновые основания. То есть, при полимеразной реакции с модифицированной бисульфитом натрия матрицы ДНК, в случае метилированного цитозина Taq полимераза поставит гуанин, а против неметилированного – аденин. Далее ПЦР продукты клонировались и клоны секвенировались. Для каждого типа клеток было проанализировано по 10 клонов. В недифференцированных ЭСК человека уровень метилирования оказался высоким, доля метилированных CpG динуклеотидов в одном сайте варьировала от 50% до 80% (рис. 3А). В эндотелиальных клетках, полученных из ЭСК человека, уровень метилирования был значительно ниже, доля метилированных CpG динуклеотидов в одном сайте метилирования варьировала от 10% до 30% (рис. 3В). В HUVEC уровень метилирования был несколько ниже, доля метилированных CpG динуклеотидов в одном сайте метилирования варьировала от 0 до 20% (рис. 3С) Таким образом, в недифференцированных ЭСК человека, которые не экспрессируют GATA–2, промоторный район транскрипционного фактора гиперметилирован, а в клетках, экспрессирующих GATA–2, он гипометилирован. Таким образом, нами показано, что метилирование селективного промотора GATA–2 в ЭСК человека может оказывать влияние на экспрессию этого транскрипционного фактора. Эпигенетический контроль селективного промотора GATA–2 был недавно обнаружен в гемопоэтических клетках [12]. Учитывая продемонстрированное нами гипометилирование промотора транскрипционного фактора GATA–2, можно сделать вывод, что при эндотелиальной дифференцировке селективный промотор играет такую же важную роль, как при гемопоэтической.

Анализ транскрипции GATA–3 выявил низкий уровень экспрессии гена в недифференцированных ЭСК человека и высокий уровень экспрессии в клетках эндотелия из ЭСК и в HUVEC (см. рис. 1). Аналогичные данные были получены в работе S. Levenberg и соавторов [11]. Как и в случае GATA–2, у GATA–3 обнаружено два промотора. Альтернативный промотор находится на расстоянии примерно 10 т.п.н. от основного промотора [19]. Экспрессия с альтернативного промотора обнаруживалась только в тканях головного мозга, в остальных тканях экспрессии с этого промотора не детектировалось. Поэтому для изучения возможной эпигенетической регуляции гена GATA–3 нами была выбрана область основного промотора гена. Для получения фрагмента регуляторного района гена использовали праймеры на значимую цепь с 228 по –115 нуклеотид относительно старта транскрипции. В недифференцированных ЭСК человека исследуемая область была гиперметилирована, и уровень варьировал от 60% до 90% метилированных CpG динуклеотидов (рис. 4А). В эндотелии, полученном из ЭСК человека, уро–

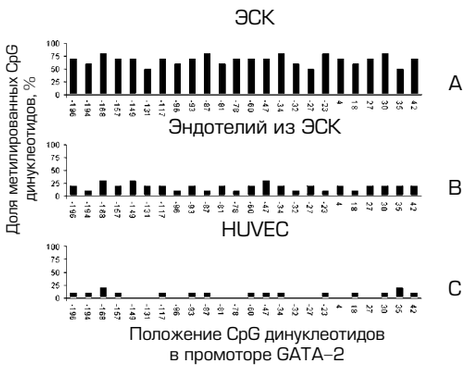

Рис. 3. Результаты бисульфитного секвенирования промоторной области гена GATA–2 с 43 по –187 нуклеотид относительно старта транскрипции: А – ЭСК человека; В – эндотелий, полученный из ЭСК человека; С – HUVEC

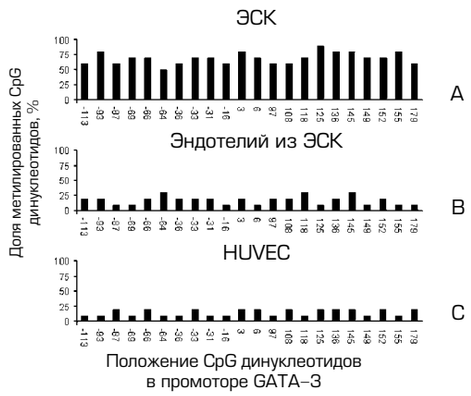

Рис. 4. Результаты бисульфитного секвенирования промоторной области гена GATA–3 с 228 по –115 нуклеотид относительно старта транскрипции: А – из ЭСК человека; В – эндотелий, полученный из ЭСК человека; С – HUVEC

вень метилирования был низкий – от 10% до 30% метилированных CpG (рис. 4B). В HUVEC наблюдался схожий уровень метилирования – от 10% до 20% метилированных CpG (рис. 4C). Таким образом, полученные нами данные говорят о том, что даже в случае гиперметилирования основного промотора гена GATA-3 наблюдается экспрессия гена в недифференцированных ЭСК человека. Из этого следует, что наблюдаемый уровень метилирования основного промотора в недифференцированных ЭСК недостаточен для полного ингибирования экспрессии GATA-3 и указывает на существование двух возможных механизмов поддержания экспрессии гена. Во-первых, для некоторых промоторов ингибирование, опосредованное метилированием ДНК, эффективно лишь в контексте хроматина. Для пассивного деметилирования требуется, чтобы клетка прошла некоторое количество делений без участия поддерживающих ДНК метилтрансфераз. Модификация хроматина осуществляется активно и происходит раньше, чем пассивное деметилирование. Вероятно, когда еще не произошло полного деметилирования промоторной области, а хроматин уже приобрел «открытое» состояние, возможна посадка транскрипционных факторов, не чувствительных к метилированию ДНК, и активация транскрипции. Вторым возможным вариантом является работа альтернативного промотора гена GATA-3 в ЭСК человека. В рамках настоящей работы альтернативный промотор не исследовался. Тем не менее, опираясь на полученные нами данные по существенному увеличению экспрессии GATA-3 в дифференцированных клетках эндотелия, мы можем утверждать, что гипометилирование промотора гена по мере дифференцировки ЭСК человека в клетки эндотелия оказывает положительное влияние на транскрипцию гена GATA-3.

В трансгенных мышах репортерная конструкция с промотором гена eNOS экспрессируется только в эндотелии, тогда как эписомная репортерная конструкция, содержащая промотор eNOS, экспрессировалась и в клетках, которые в норме не содержат РНК eNOS [15. 20]. Это дало возможность предположить эпигенетическую регуляцию экспрессии гена. Данная гипотеза была подтверждена Y. Chan с соавт. [15]. Ими было показано, что промоторная область гена eNOS в эндотелиальных клетках гипометилирована, тогда как в клетках других типов гиперметилирована. *In vitro* метилирование эписомной репортерной конструкции с промотором eNOS также приводило к существенному понижению экспрессии. Метилирование регуляторного района защищает промоторную область от посадки конститутивных транскрипционных факторов, блокируя экспрессию eNOS в клетках не эндотелиальной природы. В дальнейших исследованиях этой группы было продемонстрировано, что эпигенетическая регуляция экспрессии осуществляется не только на уровне метилирования ДНК, но и модификации хроматина [21]. Мы решили изучить роль метилирования в регуляции экспрессии гена eNOS при дифференцировке ЭСК человека в клетки эндотелия. По результатам ОТ-ПЦР ген eNOS экспрессируется в клетках эндотелия, полученных из ЭСК, и в HUVEC и не экспрессируется в недифференцированных ЭСК человека (см. рис. 1). По данным Y. Chan с соавт. [15], наиболее существенным эпигенетическим модификациям в эндотелиальных клетках подвергается регуляторный район гена eNOS в ближайшем к старту транскрипции районе, поэтому для бисульфитного секвенирования нами были использованы парапраймеры на значимую цепь на область с 13 по -297 нуклеотид относительно старта транскрипции. Для каждого типа клеток было проанализировано по 10 клонов. Уровень метилирования выбранной области в недифференцированных ЭСК человека был высоким и доля метилированных CpG динуклеотидов в каждом сайте метилирования варьировала от 70% до 90% (рис. 5A). В эндотелиальных клетках, полученных из ЭСК человека, наблюдался низкий уровень метилирования, доля метилированных CpG динуклеотидов в каждом сайте метилирования варьировала от 10% до 30% CpG динуклеотидов (рис. 5B). В клетках HUVEC метилирование CpG динуклеотидов не превышало 10% (рис. 5C). Исследуемая регуляторная область гена eNOS содержит сайты связывания конститутивных транскрипционных факторов Sp1, Sp3, Ets-1 [13], которые активны и в клетках эмбриона [23]. Гиперметилирование этого участка в ЭСК человека, скорее всего, блокирует связывание этих факторов с промоторной областью гена, как было показано для гладкомышечных клеток стенки сосудов [15]. Известно, что транскрипционный фактор GATA-2 участвует в регуляции экспрессии гена eNOS [7]. В соответствии с нашими данными, по мере дифференцировки ЭСК в клетки эндотелия наблюдается одновременное гипометилирование регуляторных районов генов GATA-2 и eNOS. Таким образом, происходит двойной негативный контроль экспрессии eNOS в недифференцированных клетках ЭСК человека, метилирование блокирует не только промоторный район самого гена, но и промоторный район транскрипционного фактора GATA-2, контролирующего экспрессию гена eNOS. С другой стороны, не исключено, что это может быть следствием тотального гиперметилирования генома на ранних этапах эбрионального развития [17].

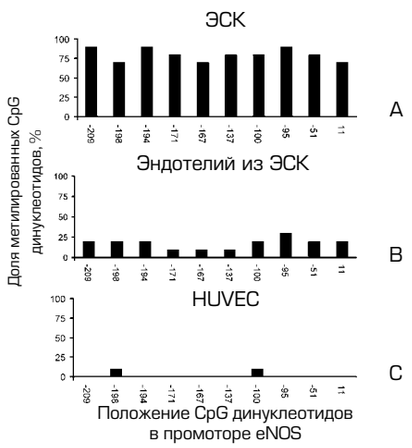

Рис. 5. Результаты бисульфитного секвенирования промоторной области гена eNOS с 13 по -297 нуклеотид относительно старта транскрипции:
A – из ЭСК человека; B – эндотелий, полученный из ЭСК человека; C – HUVEC

Из наших данных следует, что уровень метилирования промоторных районов сильно отличается в недифференцированных ЭСК и клетках эндотелия. Однако, наблюдается разница в уровне метилирования, хоть и менее существенная, между клетками эндотелия из ЭСК и HUVEC. Объяснение данного факта, возможно, заключается в том, что клетки эндотелия из ЭСК были получены *in vitro*, и, несмотря на то, что по экспрессии основных эндотелиальных маркеров и по образованию сосудоподобных структур соответствуют клеткам эндотелия, они проявляют незначительные отличия на эпигенетическом уровне. Вклад в эти отличия может вносить и гетерогенность самой эндотелиальной культуры, поскольку не ясно, к какому типу эндотелия относятся полученные клетки. Возможно, они представляют собой смесь специализированных эндотелиальных клеток. Это предположение подтверждается данными Y. Chan с соавт. [15], которыми показана разница в уровне метилирования регуляторной

области гена eNOS в HUVEC и в HuDerMVEC (human dermal microvascular endothelial cells) в то время как уровень экспрессии гена eNOS в обеих культурах клеток сходен.

Со стадии бластоцисты в клетках внутренней массы идет тотальное *de novo* метилирование генома. Однако, параллельно с *de novo* метилированием во время тканеспецифической дифференцировки идет процесс активации экспрессии тканеспецифичных генов. Мы использовали лишь одну из имеющихся линий ЭСК человека ESMO3 с генотипом XX. В недавно опубликованной работе [24] показано глобальное гипометилирование генома в XX линиях ЭСК мыши. Ранее нами была также показана эпигенетическая гетерогенность между линиями ЭСК человека [16]. Поэтому в свете этих данных требуются дополнительные эксперименты на линиях ЭСК с генотипом XY для определения зависимости полученных данных от половой детерминации клеточных линий.

Работа была выполнена при поддержке РФФИ 05-04-49310а и ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2012 годы» ГК № 02.512.11.2060.

ЛИТЕРАТУРА

1. Zambidis E.T., Oberlin E., Tavian M. et al. Blood-forming endothelium in human ontogeny: lessons from in utero development and embryonic stem cell culture. Trends Cardiovasc. Med. 2006; 16(3): 95-101.
2. Villar I.C., Francis S., Webb A. et al. Novel aspects of endothelium-dependent regulation of vascular tone. Kidney Int. 2006; 70(5): 840-53.
3. Umetani M., Mataki C., Minegishi N. et al. Function of GATA transcription factors in induction of endothelial vascular cell adhesion molecule-1 by tumor necrosis factor-alpha. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2001; 21(6): 917-22.
4. Weiss M.J., Orkin S.H. GATA transcription factors: key regulators of hematopoiesis. Exp. Hematol. 1995; 23(2): 99-107.
5. Minami T., Abid M.R., Zhang J. et al. Thrombin stimulation of vascular adhesion molecule-1 in endothelial cells is mediated by protein kinase C (PKC)-delta-NF-kappa B and PKC-zeta-GATA signaling pathways. J. Biol. Chem. 2003; 278(9): 6976-84.
6. Tsai F.Y., Orkin S.H. Transcription factor GATA-2 is required for proliferation/survival of early hematopoietic cells and mast cell formation., but not for erythroid and myeloid terminal differentiation. Blood 1997; 89(10): 3636-43.
7. Zhang R., Min W., Sessa W.C. Functional analysis of the human endothelial nitric oxide synthase promoter. Sp1 and GATA factors are necessary for basal transcription in endothelial cells. J. Biol. Chem. 1995; 270(25): 15320-6.
8. George K.M., Leonard M.W., Roth M.E., et al. Embryonic expression and cloning of the murine GATA-3 gene. Development 1994; 120(9): 2673-86.
9. Pan X., Minegishi N., Harigae H. et al. Identification of human GATA-2 gene distal IS exon and its expression in hematopoietic stem cell fractions. J. Biochem. 2000; 127(1): 105-12.
10. Burch J.B. Regulation of GATA gene expression during vertebrate development. Semin. Cell Dev. Biol. 2005; 16(1): 71-81.
11. Levenberg S., Golub J.S., Amit M. et al. Endothelial cells derived from human embryonic stem cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2002; 99(7): 4391-6.
12. Grass J.A., Boyer M.E., Pal S. et al. GATA-1-dependent transcriptional repression of GATA-2 via disruption of positive autoregulation and domain-wide chromatin remodeling. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2003; 100(15): 8811-6.
13. Pata I., Studer M., van Doorninck J.H. et al. The transcription factor GATA3 is a downstream effector of Hoxb1 specification in rhombomere 4. Development 1999; 126(23): 5523-31.
14. Fish J.E., Marsden P.A. Endothelial nitric oxide synthase: insight into cell-specific gene regulation in the vascular endothelium. Cell Mol. Life Sci. 2006; 63(2): 144-62.
15. Chan Y., Fish J.E., D'Abreo C. et al. The cell-specific expression of endothelial nitric-oxide synthase: a role for DNA methylation. J. Biol. Chem. 2004; 279(33): 35087-100.
16. 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(4): 416-20.
17. Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. Genes Dev. 2002; 16(1): 6-21.
18. Lugus J.J., Chung Y.S., Mills J.C. et al. GATA2 functions at multiple steps in hemangioblast development and differentiation. Development 2007; 134(2): 393-405.
19. Asnagli H., Afkarian M., Murphy K.M. Cutting edge: Identification of an alternative GATA-3 promoter directing tissue-specific gene expression in mouse and human. J. Immunol. 2002; 168(9): 4268-71.
20. Guillot P.V., Liu L., Kuivenhoven J.A., et al. Targeting of human eNOS promoter to the Hprt locus of mice leads to tissue-restricted transgene expression. Physiol. Genomics. 2000; 2(2): 77-83.
21. Fish J.E., Matouk C.C., Rachlis A. et al. The expression of endothelial nitric-oxide synthase is controlled by a cell-specific histone code. J. Biol. Chem. 2005; 280(26): 24824-38.
22. Zhao C., Meng A. Sp1-like transcription factors are regulators of embryonic development in vertebrates. Dev. Growth Differ. 2005; 47(4): 201-11.
23. Xu D., Wilson T.J., Chan D. et al. Ets1 is required for p53 transcriptional activity in UV-induced apoptosis in embryonic stem cells. EMBO J. 2002; 21(15): 4081-93.
24. Zvetkova I., Apedaile A., Ramsahoye B. et al. Global hypomethylation of the genome in XX embryonic stem cells. Nat. Genet. 2005; 37(11): 1274-9.

Поступила в редакцию 11.04.2007