

На правах рукописи

УДК 577.218

Волчков Павел Юрьевич

ЭПИГЕНЕТИЧЕСКАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ  
ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА В КЛЕТКИ  
ЭНДОТЕЛИЯ

Специальности: 03.00.03 – молекулярная биология,  
03.00.26 – молекулярная генетика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва

2007

Работа выполнена в лаборатории молекулярной генетики рака  
Института биологии гена РАН

Научные руководители:

**доктор биологических наук С.Л. Киселев**

**кандидат биологических наук М.А. Лагарькова**

Официальные оппоненты:

**доктор биологических наук И.А. Гривенников**

**доктор биологических наук Н.И. Дризе**

Ведущая организация:

**Научный центр сердечно-сосудистой хирургии им. А.Н. Бакулева РАМН**

Защита диссертации состоится “        “ мая 2007 года в “        “ часов на заседании  
Диссертационного совета Д 002.037.01 при Институте биологии гена РАН по адресу:  
119334, Москва, ул. Вавилова, д. 34/5

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института молекулярной биологии им.  
В.А. Энгельгардта РАН по адресу: 119991, Москва, ул. Вавилова, д. 32.

Автореферат разослан        апреля 2007 года.

Ученый секретарь

Диссертационного совета

канд. фарм. наук

Грабовская Л.С.

## **Общая характеристика работы**

**Актуальность проблемы.** Одним из эпигенетических механизмов, регулирующих экспрессию генов, является метилирование регуляторных областей генов, приводящее к активированию или ингибированию соответствующих генов. Как известно, на ранних стадиях эмбрионального развития происходят значительные изменения уровня метилирования генома. Пассивное деметилирование идет до стадии предимплантационной бластоцисты. Со стадии бластоцисты в клетках внутренней клеточной массы идет тотальное *de novo* метилирование генома, которое участвует в репрессии транскрипционно активных повторяющихся элементов генома и способствует тканеспецифической дифференцировке. Пассивное тотальное деметилирование, а затем метилирование генома на ранних стадиях развития – это часть репрограммирования генома *in vivo*. Оно необходимо для того, чтобы родительские геномы освободились от гамето-специфичного эпигенетического паттерна, посредством которого достигается тотипотентность бластомеров. Затем, по мере развития эмбриона, происходит специализация клеток и приобретение тканеспецифического эпигенетического статуса. При переносе в ооцит соматического ядра должно происходить репрограммирование генома, однако, оно происходит не полностью. Это приводит к разнообразным нарушениям в экспрессии генов, в том числе и ключевых транскрипционных факторов, необходимых для нормального развития эмбриона. Эмбриональные стволовые клетки человека (ЭСК) предоставляют широкие возможности для изучения биологии развития человека, молекулярных механизмов дифференцировки и поддержания плюрипотентности, а также открывают огромные перспективы использования ЭСК для лечения широкого спектра заболеваний. Одной из основных проблем на пути к применению производных ЭСК человека является разработка технологий контролируемой дифференцировки ЭСК и получение иммунологически совместимых с реципиентом клеток. Возможное решение проблемы иммунологической совместимости - это получение линий ЭСК путем переноса ядер соматических клеток реципиента в ооцит. Однако, для этого должна быть решена проблема неполного репрограммирования генома при переносе ядер.

Таким образом, исследование эпигенетической регуляции поддержания плюрипотентности и дифференцировки ЭСК человека и разработка методов получения необходимых типов клеток из ЭСК человека являются актуальными задачами.

### **Цели и задачи.**

Основная цель данной работы состояла в изучении эпигенетической регуляции дифференцировки ЭСК человека в клетки эндотелия. В ходе исследования предполагалось решение следующих экспериментальных задач:

1. Определить связь метилирования регуляторных районов транскрипционных факторов OCT4, NANOG и OCT4-ассоциированных генов DPPA3 и DPPA5 с их экспрессией на стадии *in vitro* гастрюляции - формирования трех зародышевых листков в эмбрионидных тельцах, для различных линий ЭСК человека.

2. Создать модель дифференцировки ЭСК человека в функциональные клетки эндотелия.

3. Используя разработанную модель дифференцировки ЭСК человека в клетки эндотелия, исследовать роль метилирования регуляторных районов транскрипционных факторов GATA-2, GATA-3 и гена eNOS в регуляции их экспрессии.

**Научная новизна и практическое значение.** Впервые показано, что метилирование регуляторных районов генов OCT-4 и NANOG коррелирует с существенным понижением уровня их экспрессии в процессе дифференцировки ЭСК человека в эмбрионидные тельца. Также, впервые обнаружено, что метилирование регуляторных районов OCT-4-ассоциированных генов DPPA-3 и DPPA-5 не влияет на изменение уровня их экспрессии в процессе дифференцировки ЭСК человека в эмбрионидные тельца. Полученные данные указывают на важность мониторинга эпигенетического статуса клеток для репрограммирования генома и позволяют выделить маркерные гены.

В ходе исследований разработан протокол получения и селекции клеток эндотелия из ЭСК человека. Используя предложенную модель, впервые показано, что статус метилирования промоторных областей генов eNOS, GATA-2 и GATA-3 коррелирует с изменением их экспрессии. В результате проведенных исследований был разработан протокол дифференцировки ЭСК человека в клетки эндотелия, которые на генетическом, эпигенетическом и физиологическом уровне соответствуют зрелым клеткам эндотелия. При решении проблемы иммунологической совместимости возможно использование таких клеток в терапевтических целях.

**Апробация работы.** Основные научные результаты диссертационной работы были представлены на Международном симпозиуме “Стволовые клетки, регенерация, клеточная терапия” (Санкт-Петербург, 2004), Wilsede Meeting “Modern trends in human leukemia” (Wilsede, Germany, 2005), всероссийской конференции “Фундаментальные науки – медицине” (Новосибирск, 2005), VI Международной конференции по молекулярной генетике соматических клеток. (Звенигород, 2005), Всероссийском симпозиуме “Биология клетки в культуре” (Санкт-Петербург, 2006) I-st Congress of the German society for SC research (Cologne, Germany, 2006), Британско-Российском совещании “Стволовые клетки: законодательство, исследования и инновации” (Москва, 2007).

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 5 статей и 8 тезисов научных конференций.

**Структура и объем работы.** Диссертационная работа изложена на \_\_\_ страницах, включает \_\_\_ таблиц и \_\_\_ рисунков и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и их обсуждения, выводов и списка литературы, включающего \_\_\_ источников.

## Результаты исследования

**Различие в эпигенетическом статусе линий ЭСК человека не затрагивает метилирования регуляторных районов генов ключевых транскрипционных факторов, необходимых для самоподдержания и сохранения плюрипотентности.** В регуляции самоподдержания и плюрипотентности ЭСК человека принимает участие ряд ключевых транскрипционных факторов, такие как OCT4, NANOG, CRIPTO, Sox2. Сложное сочетание разного уровня экспрессии и взаиморегуляции этих факторов необходимо для нормального развития эмбриона *in vivo* и самоподдержания ЭСК *in vitro*. Моделью дальнейшего развития ЭСК *in vitro*, эквивалентной стадии гаструляции, является эмбриоидное тельце (ЭТ). На стадии гаструляции начинается специализация клеток, поэтому функционирование генов, вовлеченных в поддержание плюрипотентного состояния, должно быть надежно заблокировано на этой и дальнейших стадиях развития эмбриона. Эпигенетические механизмы позволяют инактивировать транскрипцию гена через сложный многоступенчатый процесс, одним из этапов которого является метилирование ДНК. Ранее было показано, что метилирование ДНК лежит в основе регуляции экспрессии гена OCT4 мыши, и предполагается, что именно метилирование регуляторного района гена OCT4 является критическим при репрограммировании генома методом переноса ядер соматических клеток. На стадии бластоцисты в том же временном интервале, что и OCT4, экспрессируются так называемые OCT4-ассоциированные гены. Следует отметить, что часть OCT4-ассоциированных генов может реактивироваться в клонированных эмбрионах мыши, а некоторые гены остаются в неактивном состоянии. Для анализа эпигенетического статуса

были выбраны гены DPPA3 и DPPA5, которые, в отличие от OCT4, полностью реактивируются при переносе соматического ядра в ооцит мыши. Для анализа экспрессии генов OCT4, NANOG, DPPA3 и DPPA5 использовали РНК, выделенную из недифференцированных колоний ЭСК (рис.1 А), частично дифференцированных колоний (рис.1 Б) и из эмбрионных теллец на 12 день дифференцировки (рис.1 В).

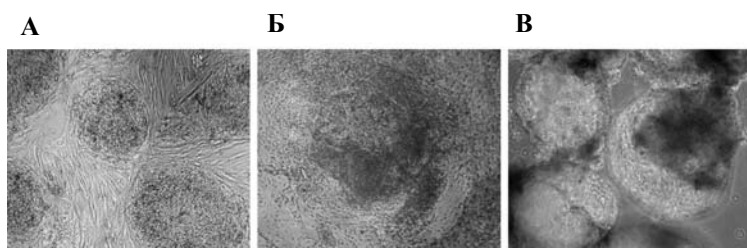


Рис.1 (А) Морфология недифференцированных колоний (объектив x4), Б – дифференцированной колонии (объектив x10), В – эмбрионных теллец (объектив x4).

Во всех проанализированных линиях ЭСК человека (ESM01-04) (рис.2) уровень экспрессии генов OCT4 и NANOG снижался по мере дифференцировки ЭСК. Наиболее низкий уровень экспрессии генов наблюдался в 12 дневных эмбрионных телльцах. Стоит отметить, что паттерн экспрессии генов OCT4 и NANOG сходен в ЭСК, полученных из разных видов млекопитающих, - по мере дифференцировки ЭСК экспрессия этих генов резко падает. DPPA3 и DPPA5 экспрессировались во всех линиях ЭСК и уровень экспрессии снижался в эмбрионных телльцах (рис.2).

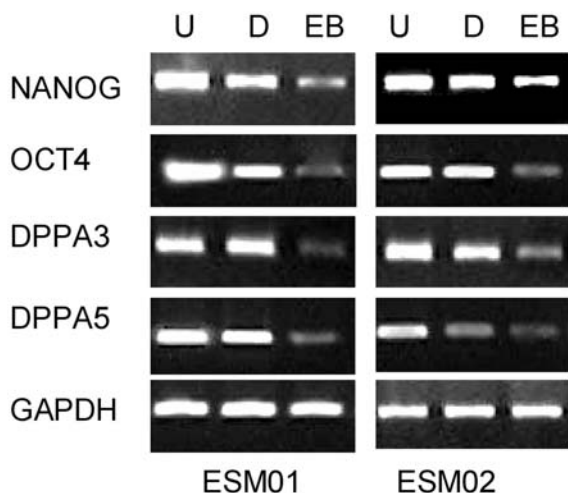


Рис.2 ОТ-ПЦР анализ генов NANOG, OCT4, DPPA3, DPPA5 в недифференцированных (U), дифференцированных ЭСК человека (D) и в эмбрионных телльцах (EB) из ЭСК человека линий ESM01 и ESM02. GAPDH использован как внутренний контроль.

Основываясь на данных экспрессии, было решено определить изменения в статусе метилирования регуляторной области человеческого гена OCT4 и 5'-концевых областей генов NANOG, DPPA3 и DPPA5 (рис.3) в линиях ЭСК человека во время дифференцировки в эмбрионные телльца. В качестве контроля была использована ДНК из терминально дифференцированных клеток: лимфоцитов периферической крови, в которых исследуемые гены не экспрессируются.

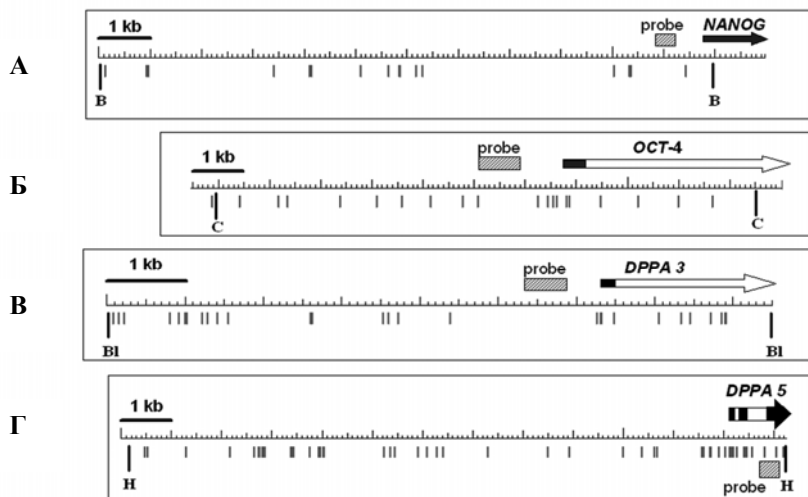


Рис.3 Карта 5'-концевых регионов генов NANOG (А), OCT4 (Б), DPPA3 (В), DPPA5 (Г). Экзоны показаны черным цветом, а направление транскрипции гена стрелкой. HpaII/MspI сайты рестрикции показаны вертикальными линиями. Гибридизационные пробы закрашены диагональной штриховкой. Буквы В, С, В1 и Н обозначают ограничивающие сайты рестрикции BamHI, Cfr91, BglIII и HindIII, соответственно.

Поскольку информация о регуляторных районах изучаемых генов человека ограничена, статус метилирования ДНК анализировался с помощью Саузерн-блот гибридизации геномной ДНК, обработанной чувствительной к метилированию рестриктазой HpaII и нечувствительной к метилированию MspI с пробами, соответствующими 5'-концевым участкам исследуемых генов. Выбранный подход позволяет проанализировать качественные изменения метилирования на большом участке генома (в нашем случае 8-12 т.п.н.), то есть анализируются все вероятные регуляторные области, которые попадают в исследуемый участок. Регуляторная область гена OCT4 млекопитающих достаточно хорошо изучена. Сравнительный анализ статуса метилирования и уровня ацетилирования в ЭСК и трофобластах мыши выявил строгую взаимосвязь между эпигенетическим статусом гена и его активностью. Однако, подобные эксперименты не проводились на клетках человека, поэтому был проанализирован статус метилирования 5'-области гена OCT4 человека, соответствующей регуляторной области гена OCT4 мыши. Гибридизационный анализ показал, что вся область между ограничивающими сайтами рестрикции размером около 10 т.п.н. и включающая промоторную область гена OCT4 не метилирована в недифференцированных ЭСК (рис.4А). Во время дифференцировки в эмбрионные тельца, в которых экспрессия OCT4 все еще наблюдается, но уровень значительно снижен, исследуемая область гена частично метилирована во всех исследованных линиях ЭСК человека. На рисунке 4А приведены результаты, полученные для линии ESM02, для остальных линий были получены аналогичные результаты. Стрелками указаны гибридизующиеся рестрикционные фрагменты, соответствующие полностью неметилированному состоянию. Кроме них, имеются гибридизующиеся рестрикционные фрагменты, скорее всего соответствующие частичному метилированию исследуемой области. Частичное метилирование в ЭТ можно объяснить тем, что ЭТ представляют собой

гетерогенную популяцию клеток на разных стадиях дифференцировки, с разным уровнем экспрессии гена OCT4.

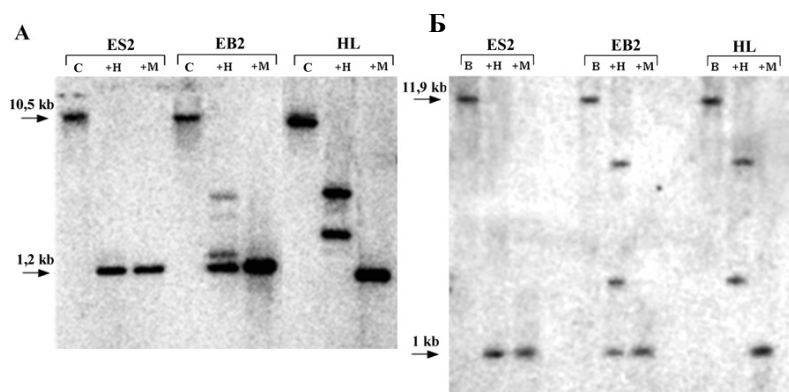


Рис.4 Анализ уровня метилирования промоторной области гена OCT4 и предполагаемой регуляторной области гена NANOG. (А) Саузерн-блот гибридизация OCT4 пробы с геномной ДНК из колоний ЭСК (ES), эмбрионных телец (EB) и из лимфоцитов периферической крови человека (HL), обработанной Cfr91 (C), Cfr91 и HpaII (+H), Cfr91 и MspI (+M). (Б) Саузерн-блот гибридизация NANOG пробы с геномной ДНК из колоний ЭСК (ES), эмбрионных телец (EB) и из лимфоцитов периферической крови человека (HL), обработанной BamHI (B), BamHI и HpaII (+H), BamHI и MspI (+M). Молекулярный вес гибридизационных полос обозначен сбоку.

Таким образом, данные, полученные на ЭСК человека вместе с данными, полученными на ЭСК мыши, показывают, что метилирование регуляторной области гена OCT4 контролирует его экспрессию.

Регуляторная область гена NANOG мало изучена. Была показана функциональная значимость некоторых регуляторных элементов 5' области гена NANOG, которые содержат сайты связывания транскрипционных факторов Oct4, Sox2, регулирующих экспрессию гена OCT4. Гены OCT4 и NANOG считаются ключевыми транскрипционными факторами, отвечающими за поддержание плюрипотентности ЭСК. Анализ уровня экспрессии гена NANOG в ЭСК человека и в ЭТ показал, что во время дифференцировки уровень экспрессии NANOG аналогичен экспрессии OCT4 (экспрессия существенно снижалась в процессе дифференцировки в эмбрионные тельца (рис. 2)). Был проанализирован уровень метилирования 5'- области гена NANOG размером 12 т.п.н., куда могли попадать основные регуляторные элементы гена. Как видно из рисунка 4, регуляторная область гена NANOG не метилирована в недифференцированных ЭСК и частично метилирована в эмбрионных тельцах (рис.4Б). Наличие двух дополнительных гибридизующихся рестрикционных фрагментов в образцах из эмбрионных телец и в контроле можно объяснить аллель – специфическим метилированием. Изменение статуса метилирования 5'-концевой области гена NANOG в процессе дифференцировки ЭСК в ЭТ происходит сходно с изменением статуса метилирования регуляторной области гена OCT4. Регуляторные участки гена NANOG, определяющие экспрессию гена лежат внутри области, взятой нами для анализа статуса метилирования регуляторного района гена. Транскрипционные факторы OCT4 и NANOG позитивно регулируют экспрессию друг друга, то есть поддерживают уровень экспрессии друг друга и не дают клеткам дифференцироваться. Суммируя наши результаты,



полученные на ЭСК человека, и данные, полученные на ЭСК мыши, можно предположить, что сайленсинг транскрипции генов OCT4 и NANOG в дифференцированных тканях млекопитающих происходит за счет одновременного или очень близкого по времени гиперметилирования их промоторных районов. При инактивации одного из факторов ЭСК смещаются в дифференцировку по одному из путей. Для того, чтобы при дальнейшем развитии бластоцисты до стадии гаструлы получались производные всех трех зародышевых листков, вероятно, необходима одновременная инактивация транскрипционных факторов, участвующих в поддержании плюрипотентности. Такая одновременная инактивация могла бы осуществляться с помощью эпигенетических механизмов. С другой стороны, учитывая эпигенетическую инактивацию OCT4 и NANOG в соматических клетках, можно предположить, что при репрограммировании генома, а именно, процедуре переноса ядер соматических клеток, будет происходить неполная реактивация не только гена OCT4, но и NANOG. Несомненно, это еще больше усложнит разработку технологии переноса ядер, поскольку оба гена кодируют транскрипционные факторы, играющие ключевую роль в раннем эмбриогенезе.

**Эпигенетический статус регуляторных областей OCT4-ассоциированных генов DPPA-3 и DPPA-5 варьирует в разных линиях ЭСК человека, но не влияет на их экспрессию.** Регуляторные области генов DPPA3 и DPPA5 не изучены. Основываясь на данных экспрессии генов DPPA, было предположено, что регуляция их экспрессии осуществляется аналогично генам OCT4 и NANOG. Был проанализирован статус метилирования генов DPPA3 и DPPA5 в клетках линий ESM01, ESM02, ESM03 и в лимфоцитах периферической крови человека. 5'-концевая область гена DPPA3 полностью метилирована в недифференцированных клетках линии ESM02 и частично метилирована в эмбриодных тельцах, а в недифференцированных клетках линии ESM01 и эмбриодных тельцах частично метилирована (рис.5А). Схожие изменения в статусе метилирования наблюдаются и в 5'-концевой области гена DPPA5 во время дифференцировки ЭСК в эмбриодные тельца. 5'-концевая область гена DPPA5 метилирована в недифференцированных клетках линии ESM02 и частично метилирована в эмбриодных тельцах, а в недифференцированных клетках линии ESM01 и эмбриодных тельцах частично метилирована (рис.5Б). Оказывается, что полученные линии ЭСК имеют разный статус метилирования аутосомных генов, для которых не показано прямое участие в регуляции самоподдержания ЭСК. Таким образом, было продемонстрировано, что полученные по одному протоколу линии ЭСК отличаются статусом метилирования в области аутосомных генов, не вовлеченных напрямую в поддержание плюрипотентности.

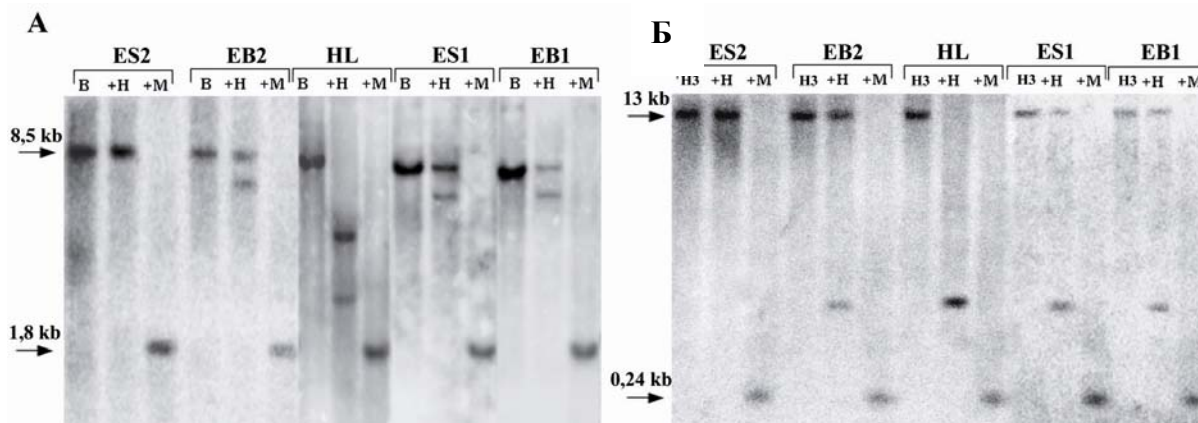


Рис.5 Анализ уровня метилирования предполагаемых регуляторных 5'-концевых областей генов DPPA3 и DPPA5. (А) Саузерн-блот гибридизация DPPA3 пробы с геномной ДНК из колоний ЭСК (ES), эмбрионных телец (EB) и из лимфоцитов периферической крови человека (HL), обработанной BglII (B), BglII и HpaII (+H), BglII и MspI (+M). (Б) Саузерн-блот гибридизация NANOG пробы с геномной ДНК из колоний ЭСК (ES), эмбрионных телец (EB) и из лимфоцитов периферической крови человека (HL), обработанной HindIII (H3), HindIII и HpaII (+H), HindIII и MspI (+M). Молекулярный вес гибридизационных полос обозначен сбоку.

Разный статус метилирования генов DPPA3 и DPPA5 не влияет на их экспрессию в ЭСК и на процесс дифференцировки в эмбрионные тельца. Гиперметилирование регуляторной области гена часто ведет к молчанию гена. Однако, в данном случае метилирование не приводит к ингибированию экспрессии генов. Эти данные показывают, что экспрессия генов DPPA3 и DPPA5 в ЭСК человека не зависит от метилирования и потенциально возможна их реактивация после репрограммирования генома. Экспрессия генов OCT4 и NANOG зависит от статуса метилирования их промоторной области и поэтому они хуже реактивируются при соматическом переносе ядер.

На стадии морулы у мыши геном еще гипометилирован, а на стадии бластоцисты во внутренней клеточной массе происходит полногеномное метилирование. У человека временной интервал метилирования генома в раннем эмбриогенезе несколько отличается. Одно из возможных объяснений разного статуса метилирования линий ЭСК человека, заключается в том, что внутренняя клеточная масса, из которой получали ЭСК, была взята с небольшой временной разницей, в то время, когда идет волна тотального метилирования генома. Это значит, что у ЭСК при получении есть предсуществующий эпигенетический статус, который теоретически может влиять и на их потенциал дифференцировки. Интересно то, что человеческие гены NANOG и DPPA3 расположены близко друг к другу на 12 хромосоме. Таким образом, разное метилирование близко расположенных районов в культуре ЭСК говорит о том, что эпигенетическая регуляция во время раннего эмбрионального развития хорошо скоординирована. Другое объяснение вариаций в статусе метилирования между линиями ЭСК человека может быть основано на том, что линии ЭСК, в которых наблюдалась разница в эпигенетическом статусе DPPA3 и DPPA5, имеют различные генотипы (XX и XY). Хотя гены DPPA3 и DPPA5 расположены на аутосомах, мы

не можем исключить вероятность того, что статус метилирования может быть связан с ранними событиями половой детерминации. Относительно недавно было показано глобальное гипометилирование генома в XX линиях ЭСК мыши. Глобальное гипометилирование может привести к активации различных регуляторных элементов, что, в свою очередь, может привести к разнице в паттерне экспрессии генов клеточных линий с разным генотипом XX и XY. На основании наших результатов можно предположить, что линии ЭСК человека могут использовать сходные принципы поддержания плюрипотентного состояния, но их эпигенетическое наследие может быть различным, и, соответственно, потенциал дифференцировки тоже может отличаться.

**Получение эндотелиальных клеток из ЭСК человека в двумерной системе.** Как уже было отмечено ранее, при спонтанной дифференцировке ЭСК способны к образованию производных трех зародышевых листков. Спонтанная дифференцировка обычно наблюдается при переводе ЭСК в суспензию и их росте в виде ЭТ. Однако, условия культивирования, а, возможно, и индивидуальные особенности линий ЭСК, сильно влияют на их способность к дифференцировке в конкретный клеточный тип.

Было решено проверить, есть ли эндотелиальные клетки в ЭТ, образованных из линий ЭСК человека, имеющихся в распоряжении. Для анализа было решено взять линии hESM01 и hESM03. Эти линии, полученные в лаборатории ранее, проявляли характерную для данного типа клеток морфологию, экспрессировали соответствующие маркеры и имели нормальный кариотип. При переводе в суспензионную культуру ЭСК формировали ЭТ с характерной морфологией для данного типа структур. При иммуногистохимическом анализе эмбрионидных телец после 10-12 дней культивирования были обнаружены в небольшом количестве (не более 5%) эндотелиоцитоподобные клетки, экспрессирующие CD31.

О возможности подобной дифференцировки и в двумерной системе говорил тот факт, что при спонтанной дифференцировке hESM01 и hESM03 встречались группы клеток, похожие на клетки эндотелия, экспрессирующие CD31 и vWF. Поскольку существенной разницы в количестве эндотелиальных клеток при спонтанных дифференцировках ЭСК линий hESM01 и hESM03 в ЭТ не было обнаружено, а линия hESM01 проявила тенденцию к нестабильности кариотипа, в дальнейшем эксперименты проводились на клетках линии hESM03 на 28 – 38 пассажах.

Отсутствие в литературе данных по дифференцировке ЭСК человека в двумерной системе без формирования ЭТ в эндотелиальные клетки потребовало подбора условий и сред для дифференцировки. Мы использовали различный состав сывороток с различным сочетанием факторов роста, концентраций и типов сывороток и остановились на наиболее эффективных условиях культивирования.

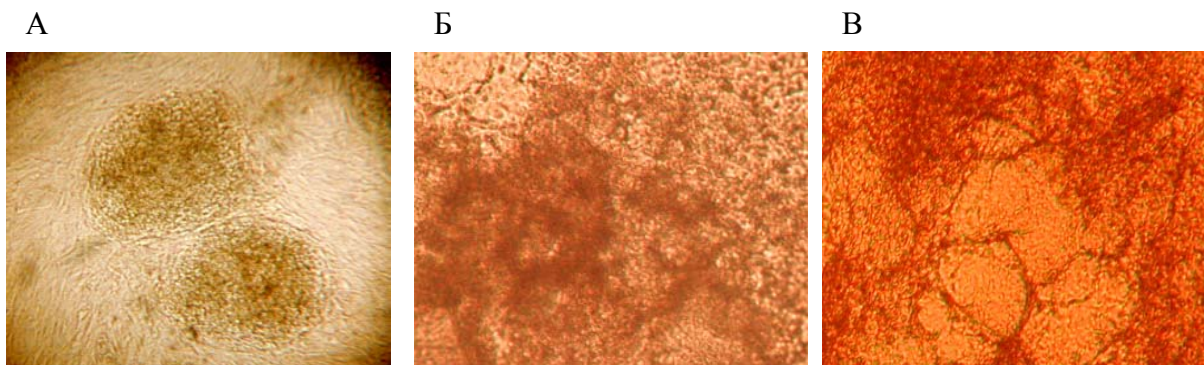


Рисунок 6. Дифференцировка ЭСК человека в эндотелиальные клетки в двумерной системе: А- недифференцированные колонии ЭСК на фидере МЭФ; Б- дифференцированные производные, 5 день культивирования; В- сосудистоподобные структуры, 7 день культивирования

Колонии недифференцированных ЭСК (Рис. 6А) снимали с обработанного коллагеназой фидера механически, разрезая на фрагменты размером 300-500 клеток, и помещали на чашки Петри, покрытые коллагеном IV типа. В среде DMEM/F12, содержащей 15% FBS, bFGF (4 нг/мл), SCF (20 нг/мл), VEGF (20 нг/мл), клетки на 5 день приобретали морфологию дифференцированных производных (Рис. 6Б). На 7 день культивирования колонии содержали кластеры сосудистоподобных структур (Рис. 6В). Разработанный протокол дифференцировки позволял получить культуру клеток, в которой доля эндотелиальных клеток составляла до 50%. Иммуноцитохимический анализ показал, что большая часть клеток была положительна не только по раннему маркеру эндотелия, но и экспрессировала маркер позднего, дифференцированного эндотелия – фактор Вон Виллибрандта (vWF).

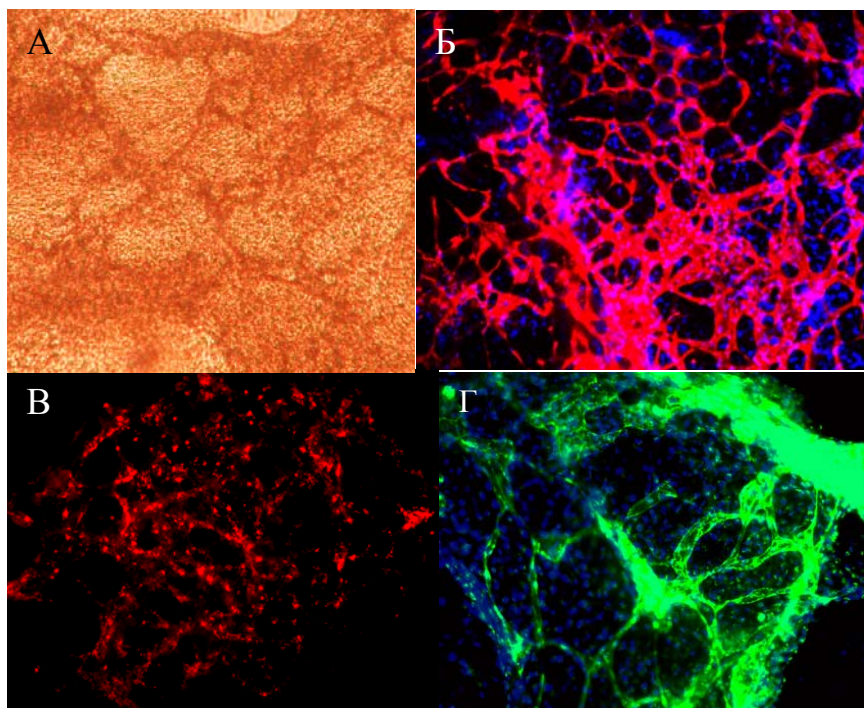


Рис. 7. Анализ эндотелия полученного из ЭСК после 8 дней (А-В) и 12 дней (Г) культивирования в среде для дифференцировки А- сосудистоподобные структуры - светлое поле; Б- экспрессия раннего эндотелиального маркера CD31; ядра окрашены DAPI; В- экспрессия позднего эндотелиального маркера vWF, Г- экспрессия позднего эндотелиального маркера CD105, ядра окрашены DAPI.

Функциональная активность клеток была проверена следующим образом: клетки, дифференцированные в двумерной системе, образовывали сложные сосудистоподобные сети

на подложке, покрытой коллагеном IV. Таким образом, нами была показана возможность высокоэффективного получения в двумерной системе клеток, несущих поверхностные маркеры и имеющих физиологическую активность клеток эндотелия.

### **Селекция и анализ эндотелиальных клеток из дифференцированных ЭСК человека.**

Контролируемая дифференцировка, во-первых, должна приводить преимущественно к желаемому клеточному фенотипу. Во-вторых, должна существовать возможность селекции нужных популяций клеток, причем сам процесс селекции не должен существенным образом влиять на жизнеспособность и дифференцировку. Следующей задачей являлась разработка метода селекции предшественников эндотелия и эндотелиальных клеток из дифференцированных на коллагене IV ЭСК человека. Был выбран метод иммуномагнитной сепарации MACS (magnetic activated cell sorting), - эффективная технология магнитного сортирования, основанная на разделении клеток по поверхностным антигенам. Подобный метод позволяет быстро и эффективно (с чистотой более 98%) провести селекцию нужной популяции клеток по поверхностным маркерам.

Для выбора поверхностного антигена для иммуномагнитной сепарации эндотелиальных клеток, был проведен анализ экспрессии известных эндотелий-специфичных поверхностных маркеров в недифференцированных клетках ЭСК человека и в HUVEC с помощью иммуноцитохимического анализа. Маркерами эндотелия являются следующие белки: CD31/PICAM1, Flk1/VEGFR1, CD105/endoglin, VE-cadherin и CD133. Параметры выбора поверхностного маркера для селекции были следующие: белок не должен экспрессироваться в недифференцированных ЭСК и должен экспрессироваться в эндотелии, поверхностный маркер должен экспрессироваться на разных стадиях дифференцировки ЭСК в эндотелий, что необходимо для того, чтобы процесс сепарации не зависел строго от времени дифференцировки. Так как существует разница в экспрессии многих белков в различных линиях ЭСК человека, то экспрессия всех возможных «кандидатных» маркеров была проверена для линий ЭСК ESM01 и ESM03, не полагаясь только на единичные литературные данные. В качестве положительного контроля использовали клетки пупочной вены человека (HUVEC). Иммуногистохимический и ОТ-ПЦР анализы подтвердили наличие экспрессии Flk1 в недифференцированных клетках линий ESM01 и ESM03. Временной интервал экспрессии CD31 и VE-cadherin оптимально подходит для селекции. Для селекции эндотелия, полученного из ЭСК в двумерной системе был использован CD31, так как в распоряжении имелись антитела на разные эпитопы этого белка и качество имеющихся антител также диктовало использование антител к CD31.

Для проведения сепарации клетки на разных стадиях дифференцировки обрабатывали трипсином, промывали PBS, затем PBS/BSA/EDTA, и инкубировали с антителами мыши к

CD31 человека (на 1 млн клеток 10 мкг антител), затем отмывали от несвязавшихся антител и инкубировали со вторичными антителами козы против мыши, связанными с магнитными частицами. После соответствующих промывок проводили сепарацию на колонках. Фракцию CD31-положительных клеток высевали на чашки, покрытые коллагеном, в среду для эндотелиальной дифференцировки. Клетки высевали в высокой плотности (не менее 50 000 клеток на 1см<sup>2</sup>), так как посев в более низкой плотности негативно влиял на жизнеспособность клеток. Из CD31 положительной фракции отбирали аликвоты для оценки жизнеспособности клеток после сепарации, оценки чистоты популяции (иммуногистохимический анализ) и для оценки способности выделенных клеток образовывать сосудистые структуры (Matrigel assay). Как видно из рисунка 8, клетки формируют характерную для эндотелия ячеистую сосудоподобную сеть.

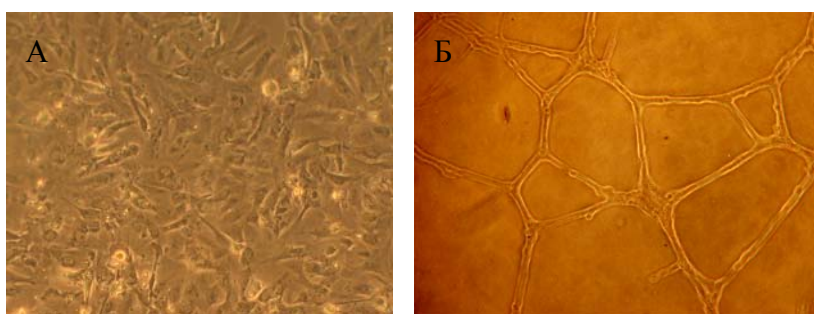


Рис.8 (А) CD31 клетки эндотелия, полученные из ЭСК, через 24 часа после селекции. Фотография в светлом поле. (Б) Тест на матригеле (Matrigel Assay), показывающий эндотелиальную природу выделенных с помощью иммуномагнитной сепарации клеток. Фотография получена с помощью светового инвертированного микроскопа.

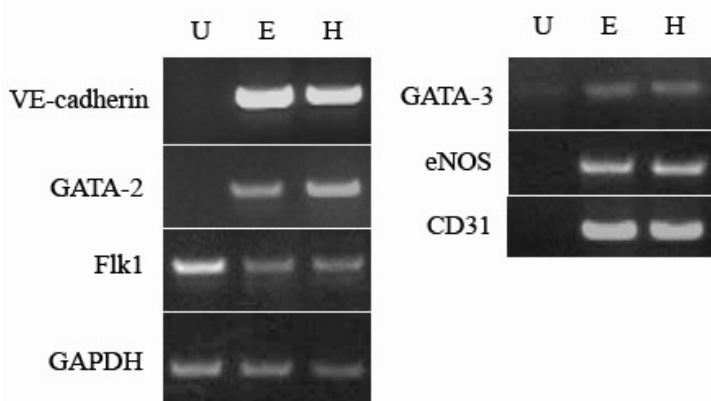


Рис.9 ОТ-ПЦР анализ генов VE-cadherin, GATA-2, Flk1, GAPDH, GATA-3, eNOS, CD31 в недифференцированных ЭСК линии ESM03 (U), клетках эндотелия из ЭСК линии ESM03, полученных с помощью иммуномагнитной сепарации (E) и в клетках эндотелия из пупочной вены (H) человека.

Иммуногистохимический анализ показал, что более 90% клеток после селекции были положительны на CD31. Анализ экспрессии генов, характерных для эндотелия, методом полуколичественного ОТ-ПЦР показал, что уровень экспрессии этих генов в клетках эндотелия из ЭСК сравним с уровнем их экспрессии в HUVEC (рис.9) Таким образом, в данной части работы было показано, что клетки эндотелия, дифференцированные из ЭСК человека, могут быть успешно очищены методом магнитной сепарации, при этом сохраняя жизнеспособность и способность к образованию сосудистоподобных структур.

**Роль метилирования в регуляции экспрессии генов GATA-2, GATA-3 при дифференцировке ЭСК человека в эндотелий.** Формирование эндотелия в эмбриогенезе и

функционирование во взрослом организме сопровождается экспрессией целого ряда транскрипционных факторов. В недавних исследованиях было показано, что транскрипционные факторы семейства GATA принимают непосредственное участие в реорганизации внеклеточного окружения дифференцированных эндотелиальных клеток, регулируя экспрессию своих генов – мишеней.

GATA-2 экспрессируется в различных типах тканей и играет важную роль в образовании гематопозитических предшественников. В процессе дифференцировки и в дифференцированных эндотелиальных клетках GATA-2 регулирует экспрессию таких генов, как eNOS, Эндотелин-1, Flk-1, ICAM-2, P-селектин, PECAM-1, Utrophin-B, vWF.

GATA-3 экспрессируется во многих тканях мышиноного эмбриона. Как GATA-1 и 2, GATA-3 принято относить к гематопозитическим транскрипционным факторам. Роль GATA-3 в эндотелии 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, а GATA-2 регулирует экспрессию GATA-3. 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 характерных эндотелиальных генов является eNOS. eNOS производит основную часть оксида азота в эндотелиальных клетках, который участвует в противовоспалительных процессах, регуляции адгезии тромбоцитов к стенкам кровеносных сосудов, а так же ингибирует пролиферацию клеток гладкой мускулатуры сосудов. eNOS экспрессируется на поздних стадиях дифференцировки эндотелия и характеризует зрелый эндотелий.

Для eNOS была показана зависимость экспрессии от эпигенетического статуса его регуляторных областей в эндотелиальных и неэндотелиальных клетках. Для транскрипционных факторов GATA-2 и GATA-3 такие исследования не проводились, поэтому было решено исследовать метилирование промоторных областей генов eNOS, GATA-2 и GATA-3 во время тканеспецифической дифференцировки ЭСК человека в клетки функционального эндотелия, для чего была использована разработанная модель дифференцировки и селекции клеток эндотелия из ЭСК человека, описанная выше.

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. 9). Считается, что экспрессия транскрипционного фактора GATA-2 характерна для раннего гемангиобласта. Паттерн метилирования промоторного района GATA-2 был

проанализирован в ЭСК человека, не экспрессирующих GATA-2, а также в клетках эндотелия, полученных из ЭСК человека, и HUVEC, экспрессирующих GATA-2. Как и другие GATA гены, GATA-2 ген млекопитающих может экспрессироваться с двух промоторов, селективного и основного. Селективный промотор активен в гематopoэтических клетках, а основной 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. С помощью бисульфитного секвенирования была проанализирована область, соответствующая селективному промотору гена GATA-2, экспрессия с которого осуществляется в гематopoэтических клетках. Эта область особенно насыщена CpG-динуклеотидами. Для этого были выбраны праймеры на значимую цепь, на область с 43 по -187 нуклеотид относительно старта транскрипции. В недифференцированных ЭСК человека уровень метилирования исследуемого района оказался высоким, доля метилированных CpG-динуклеотидов в одном сайте варьировала от 50% до 80% (рис. 10А). 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. 10Б). В HUVEC уровень метилирования был немного ниже, доля метилированных CpG динуклеотидов в одном сайте метилирования варьировала от 0 до 20% (рис. 10В) Таким образом, в недифференцированных ЭСК, которые не экспрессируют GATA-2, селективный промотор транскрипционного фактора гиперметилирован, а в клетках экспрессирующих GATA2 – гипометилирован.

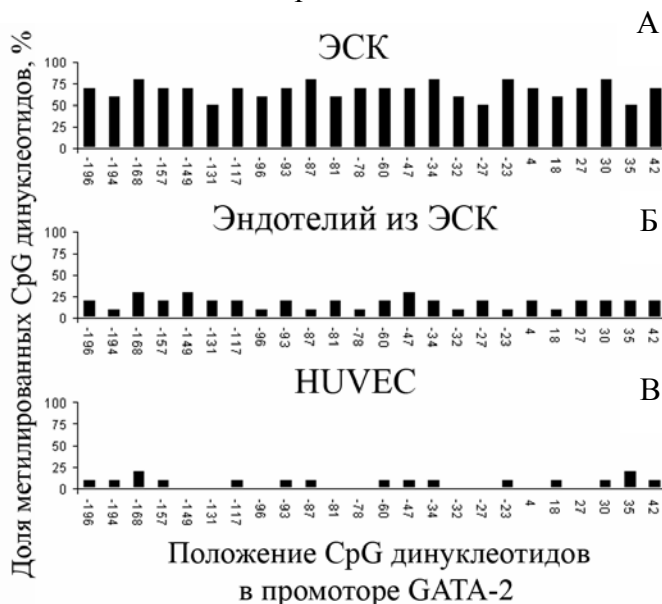


Рис.10 Результаты бисульфитного секвенирования промоторной области гена GATA-2 с 43 по -187 нуклеотид относительно старта транскрипции. (А) ЭСК человека, (Б) эндотелий, полученный из ЭСК человека, (В) HUVEC.

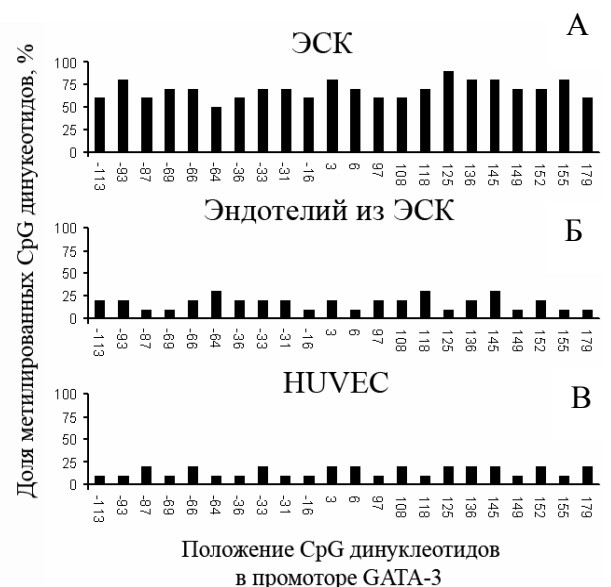


Рис.11 Результаты бисульфитного секвенирования промоторной области гена GATA-3 с 228 по -115 нуклеотид относительно старта транскрипции (А) из ЭСК человека, (Б) эндотелий, полученный из ЭСК человека, (В) HUVEC.



Из этого следует, 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 показан для гематопозитических клетках. Учитывая продемонстрированное нами гипометилирование промотора транскрипционного фактора GATA-2, можно сделать вывод, что в эмбриогенезе при эндотелиальной дифференцировке селективный промотор играет такую же важную роль, как при гематопозитической.

Анализ транскрипции GATA-3 выявил низкий уровень экспрессии гена в недифференцированных ЭСК человека и высокий в клетках эндотелия из ЭСК и в HUVEC (рис. 9). Как и в случае GATA-2, у GATA-3 существует два промотора. Альтернативный промотор находится на расстоянии примерно 10 т.п.н. от основного промотора. Экспрессия с альтернативного промотора обнаруживалась только в тканях головного мозга, в остальных тканях экспрессии с этого промотора не происходит, поэтому для изучения возможной эпигенетической регуляции гена GATA-3 нами была выбрана область основного промотора гена. Для получения фрагмента регуляторного района гена использовались 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. 11А). В эндотелии, полученном из ЭСК человека, уровень метилирования был низкий - от 10% до 30% метилированных CpG (рис. 11Б). В HUVEC наблюдался схожий уровень метилирования от 10% до 20% метилированных CpG (рис. 11В). 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 метилирование основного промотора в недифференцированных ЭСК недостаточно для полного ингибирования экспрессии GATA-3. Ранее было показано, что 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 раньше, чем пассивное деметилирование. Вероятно, когда еще не произошло полное деметилирование промоторной области, а хроматин уже приобрел “открытое” состояние, возможна посадка транскрипционных факторов, нечувствительных 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.

**Метилирование промоторной области гена eNOS при дифференцировке ЭСК человека в клетки эндотелия.** В данной работе была изучена 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 (рис. 9). По данным Chan и соавторов (Chan Y., 2004), наиболее существенным эпигенетическим модификациям в эндотелиальных клетках подвергается регуляторный район гена eNOS в ближайшем к старту транскрипции районе. Поэтому для бисульфитного секвенирования была использованы праймеры на значимую цепь на область с 13 по -297 нуклеотид относительно старта транскрипции.

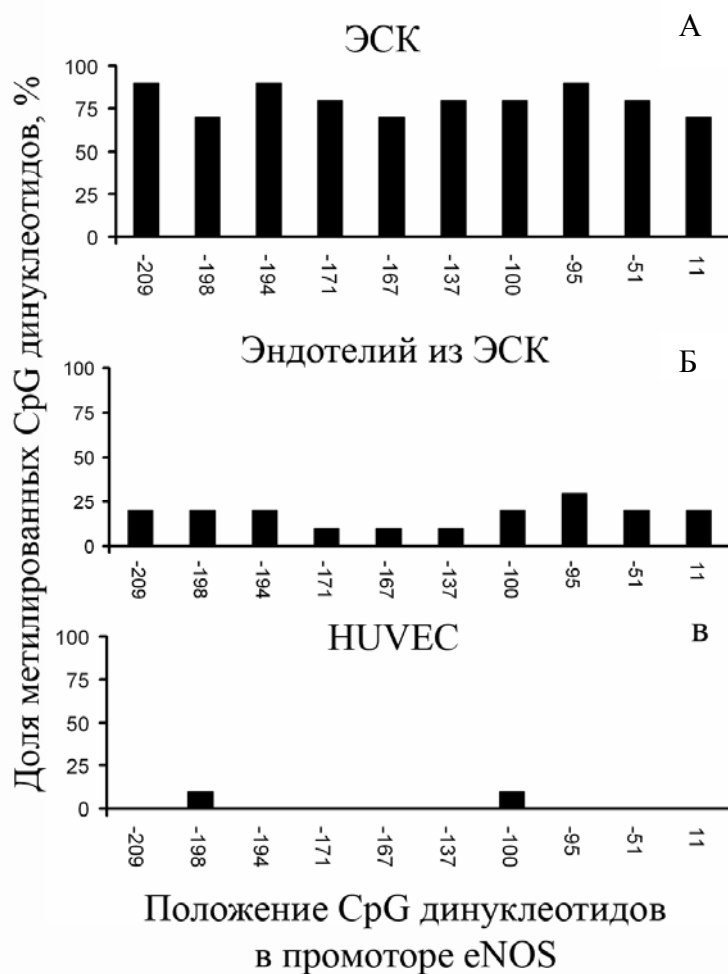


Рис.12 Результаты бисульфитного секвенирования промоторной области гена eNOS с 13 по -297 нуклеотид относительно старта транскрипции (А) из ЭСК человека, (Б) эндотелий, полученный из ЭСК человека, (В) HUVEC.

Для каждого типа клеток было проанализировано по 10 субклонов. 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. 12А). 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. 12Б). В клетках HUVEC доля метилированных CpG-динуклеотидов не превышала 10% (рис. 12В). Исследуемая регуляторная область гена eNOS содержит сайты связывания конститутивных транскрипционных факторов Sp1, Sp3, Ets-1, которые активны и в клетках эмбриона. Гиперметилирование этого участка в ЭСК человека скорее всего блокирует связывание этих факторов с промоторной областью гена, как это и было показано для гладкомышечных клеток стенки сосудов. Известно, что транскрипционный фактор GATA-2 участвует в регуляции экспрессии гена eNOS. 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 всего лишь следствием тотального гиперметилирования генома на ранних этапах эбрионального развития.

Относительно недавно был обнаружен ген NOS3AS/SONe, который кодирует бессмысловый транскрипт по отношению к eNOS. SONE и eNOS расположены «хвост к хвосту» и имеют 662 перекрывающихся нуклеотида на 3'-конце. SONE экспрессируется в неэндотелиальных клетках, и не экспрессируется в эндотелиальных. Гиперэкспрессия SONE в эндотелиальных клетках приводит к уменьшению экспрессии eNOS. Вероятно, экспрессия SONE приводит к ингибированию экспрессии гена на посттранскрипционном уровне. Был проанализирован уровень экспрессии гена SONE в ЭСК человека и в клетках эндотелия. В качестве положительного контроля на SONE использовали РНК из плаценты. Анализ экспрессии методом ОТ-ПЦР показал, что SONE не экспрессируется в ЭСК человека и в клетках эндотелия (рис. 13). Таким образом, данный эпигенетический механизм не может участвовать в регуляции экспрессии eNOS во время дифференцировки ЭСК человека в клетки эндотелия.

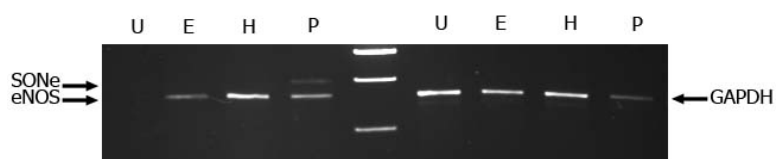


Рис.13 Анализ экспрессии гена SONE (NOS3A) и eNOS в недифференцированных ЭСК человека (U), клетках эндотелия из ЭСК (E), HUVEC (H) и в плаценте (P). GAPDH использован как внутренний контроль.

Из полученных данных видно, что уровень метилирования промоторных районов сильно отличается в недифференцированных ЭСК и клетках эндотелия. Однако, также наблюдается разница в уровне метилирования, гораздо 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 они аналогичны первичным клеткам эндотелия, таким как HUVEC, они демонстрируют отличие на эпигенетическом уровне. Возможно эти отличия возникли из-за гетерогенности самой эндотелиальной культуры, поскольку не ясно окончательно, к какому типу эндотелия относятся полученные клетки или они могут представлять смесь специализированных эндотелиальных клеток. Это предположение подтверждается данными Chan с соавторами (Chan Y., 2004), которыми показана разница в уровне метилирования регуляторной области гена eNOS в HUVEC и в HuDerMVEC (клетках эндотелия капилляров кожи), в то время как уровень экспрессии гена eNOS в обеих культурах клеток сходен.

Полученные с помощью разработанного протокола клетки эндотелия из ЭСК человека на генетическом, эпигенетическом и физиологическом уровне соответствуют клеткам зрелого эндотелия. Таким образом, было показано, что механизмы принимающие участие в дифференцировке ЭСК человека *in vitro* те же или близки к тем, которые участвуют в аналогичных процессах при развитии эмбриона *in vivo*.

## **Выводы**

1. Впервые показано, что снижение уровня экспрессии транскрипционных факторов OCT-4 и NANOG при дифференцировке ЭСК человека в клетки трех зародышевых листков, сопровождается гиперметилированием регуляторных районов этих генов. Таким образом, эффективность реактивации этих генов при репрограммировании генома *in vitro* низка.

2. Впервые показано, что экспрессия OCT-4-ассоциированных генов DPPA-3 и DPPA-5 происходит вне зависимости от статуса метилирования их регуляторных районов, который различается между линиями ЭСК человека.

3. С целью изучения эпигенетической регуляции активности генов при направленной дифференцировке ЭСК человека создана оригинальная модель прямой дифференцировки ЭСК в клетки функционального эндотелия.

4. Впервые показано, что процесс дифференцировки ЭСК в клетки эндотелия сопровождается снятием метилирования регуляторных районов генов транскрипционных факторов GATA-2, GATA-3 и гена eNOS и экспрессией этих генов.

### Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Киселев С.Л., **Волчков П.Ю.**, Филоненко Е.С., Прохорович М.А., Муфазалов И.А., Лякишева А.В., Лагарькова М.А. Молекулярная и клеточная биология линий ЭСК человека. // Молекулярная медицина. 2006. №2. Стр. 6-11.
  2. Лагарькова М.А., Лякишева А.В., Филоненко Е.С., **Волчков П.Ю.**, Рубцова К.В., Герасимов Ю.В., Чайлахян Р.К., Киселев С.Л. Характеристика мезенхимальных стволовых клеток костного мозга, выделенных методом иммуномагнитной селекции. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2006. №141(1). Стр.112-116.
  3. М.А. Lagarkova, **P.Y. Volchkov**, A.V. Lyakisheva, E.S.Philonenko, S.L. Kiselev. Diverse epigenetic profile of novel human embryonic stem cell lines. // Cell Cycle. 2006. Vol. 5. Issue 4. Pp. 416-420.
  4. М.А. Лагарькова, И.А. Муфазалов, П.Ю. **Волчков**, С.Л. Киселев. Секретируемый транскрипционный фактор НОХВ4 стимулирует дифференцировку эндотелия из ЭСК человека. // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2007. №1. Стр. 56-59.
  5. **П.Ю. Волчков**, М.А. Лагарькова, М.А. Прохорович, С.Л. Киселев Двойной негативный контроль генов, контролирующих направленную дифференцировку ЭСК человека в эндотеолий. // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2007. №2.
- Тезисы конференций:
6. М.А. Лагарькова, М.В. Прыжкова, **П. Волчков**, С.Л. Киселёв. Молекулярно-генетическая характеристика линий эмбрионально-стволовых клеток человека на ранних стадиях дифференцировки. // Международный симпозиум “Стволовые клетки, регенерация, клеточная терапия”. Санкт-Петербург. 25 - 27 октября 2004.
  7. М.А. Lagarkova, **P.Y. Volchkov**, A.V. Lyakisheva, E.S.Philonenko, S.L. Kiselev. Promoter regions divers methylation profile of pluripotency-related genes in newly derived hESC lines. // XVI. Wilsede Meeting “Modern trends in human leukemia”. June 18-22, 2005. Wilsede, Germany. Pp. 78.
  8. Лагарькова М.А., **Волчков П.Ю.**, Филоненко Е.С., Медвинский А., Киселев С.Л. Дифференцировка эмбриональных стволовых клеток в клетки эндотелия. // Всероссийская конференция «Фундаментальные науки – медицине» 4-8 сентября 2005. Новосибирск. Стр. 37.
  9. М.А. Лагарькова, **П.Ю. Волчков**, Е.С. Филоненко, С.Л. Киселев. Проблемы направленной дифференцировки эмбриональных стволовых клеток. // Конференция "Биология стволовых клеток: фундаментальные аспекты" 17-18 ноября 2005. Москва. Стр. 5.

10. С.Л. Киселев, Лагарькова М.А., Филоненко Е.С., Прохорович М.А., **Волчков П.Ю.** Молекулярная генетика линий эск человека и проблемы направленной дифференцировки. // VI Международная конференция по молекулярной генетике соматических клеток. 12-16 декабря 2005. Звенигород.
11. М.А. Лагарькова, **Волчков П.Ю.**, Филоненко Е.С., Медвинский А., Киселев С.Л. Дифференцировка эмбриональных стволовых клеток человека в клетки эндотелия. // Всероссийский симпозиум “Биология клетки в культуре”. Санкт-Петербург. 17 - 19 октября 2006.
12. Kiselev S., Lagarkova M., Prokhorovich M., **Volchkov P.** Human embryonic stem cell lines: cultivation and differentiation. // I-st Congress of the German society for SC research. 2006. Cologne, Germany. Pp. 95.
13. **Volchkov P.Y.**, Lagarkova M.A., Prokhorovich M.A., Kiselev S.L. Epigenetic control of human embryonic stem cells differentiation into endothelial cells. // Британско-российское совещание “Стволовые клетки: законодательство, исследования и инновации.” Москва. 2007.