

УДК 576.32/.36

ТРАНСКРИПЦИЯ ГЕНОВ, ОТВЕТСТВЕННЫХ ЗА БИПОТЕНТНЫЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВОЧНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК, ПРИ РАЗЛИЧНОМ УРОВНЕ O₂

© 2020 г. Член-корреспондент РАН Л. Б. Буравкова^{1,*}, М. И. Ездакова¹, И. В. Андрианова¹, Е. А. Голикова¹, Е. Р. Андреева¹

Поступило 24.12.2019 г.

После доработки 06.02.2020 г.

Принято к публикации 06.02.2020 г.

В митотически неактивных мультипотентных мезенхимальных стромальных клетках (МСК) из жировой ткани человека проанализирована динамика изменения экспрессии генов, связанных с остео- и адипокоммитированием при культивировании в условиях 20% (стандартный лабораторный) и 5% (близкий к тканевому) уровня O₂. На 14 сутки культивирования при 5% O₂ в МСК спонтанно увеличивалась транскрипция генов, связанных с остео- (*RUNX2*, *SP7*, *BGLAP*, *SPPI*) и адиподифференцировкой (*CEBPA*, *PPGA*, *ADIPOQ*) ($p < 0.05$). Таким образом, культивирование при тканевом уровне O₂ обеспечивает формирование бипотентного транскрипционного профиля МСК, что может способствовать улучшению их гемопоэз-поддерживающих свойств.

Ключевые слова: мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки, коммитирование, экспрессия генов

DOI: 10.31857/S2686738920020079

Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (МСК) являются одним из наиболее востребованных продуктов для регенеративной медицины в связи с их высокой пролиферативной и паракринной активностью, а также мультилинейным дифференцировочным потенциалом [1]. Способность поддерживать функционирование различных типов клеток является одним из наиболее привлекательных свойств МСК, востребованным в различных экспериментальных протоколах, в частности, для *ex vivo* экспансии гемопоэтических стволовых и прогениторных клеток (ГСПК) [2]. Эффективность реализации стромальной функции МСК зависит от целого ряда внешних и внутренних факторов, сочетание которых может позволить дополнительно улучшить потенциал МСК при подготовке к строма-зависимой экспансии [3]. Низкий уровень O₂ — “физиологическая” гипоксия (0.5–5%), является одним из важных параметров, регулирующих функциональную активность клеток в костном мозге, в том числе и МСК. Известно, что культи-

вирование при значениях O₂, близких к тканевым, приводит к изменению функциональной активности МСК. В частности, показано увеличение пролиферативной активности и снижение остео- и адипо-индуцированной дифференцировки [4–7]. Ранее мы показали, что сокультивирование ГСПК из пуповинной крови и МСК из жировой ткани при “физиологической” гипоксии (5% O₂) позволяет увеличить долю CD34⁺ клеток в популяции ГСПК и обеспечить преимущественное развитие определенных гемопоэтических ростков [8]. Поскольку в гемопоэтической нише МСК не пролиферируют, для *ex vivo* экспансии ГСПК предпочтительно использование митотически неактивных клеток после гамма-облучения или обработки митомицином С. При сочетании факторов, характерных для тканевой ниши ГСПК — стромального слоя из непролиферирующих МСК и тканевого содержания O₂, мы продемонстрировали обогащение популяции ГСПК некоммитированными предшественниками, которые могут обеспечивать длительное поддержание кроветворения *in vivo* (LTC-IC) [9].

Особый интерес представляют сигналы, регулирующие остео- и адиподифференцировку МСК, поскольку гемопоэтическое микроокружение формируют стромальные клетки разной сте-

¹ Институт биомедицинских проблем Российской академии наук, Москва, 123007 Россия

*e-mail: buravkova@imbp.ru

пени коммитирования [10]. Немногочисленные работы по изучению вклада различных типов стромальных клеток – производных МСК костного мозга в поддержание гемопоэза, показали, что более высокую гемопоэз-поддерживающую активность демонстрируют ранние стромальные предшественники, обладающие бипотентным остео/адипо-дифференцировочным потенциалом. Это обеспечивается существенным изменением профиля транскрипции за счет снижения активности генов, опосредующих связь клетка–матрикс, и увеличением активности генов хемокинов семейства CXC [11, 12].

Целью настоящей работы была оценка динамики изменения бипотентного транскрипционного профиля митотически неактивных МСК, культивируемых при различном уровне O_2 .

МСК из жировой ткани человека выделяли и культивировали при 5% O_2 (мультигазовый инкубатор Sanyo, Япония), как описано [9]. Использовали МСК 2–4 пассажей. Иммунофенотип ($CD73^+$, $CD90^+$, $CD105^+$, $CD45^-$, $CD34^-$) подтверждали при помощи специфических антител (IO Test, Beckman Coulter) методом проточной цитофлуориметрии на приборе Accuri C6 (BD, США). Для получения митотически неактивных клеток МСК инкубировали 18 ч с 1.5 мкг/мл митомицина С (Sigma-Aldrich, США). Затем пересекали в чашки Петри D35 мм (Corning, США) с плотностью 70–80% от конфлуэнта, и далее культивировали при 20 и 5% O_2 в течение 2 недель.

Для оценки динамики профиля транскрипции МСК определяли экспрессию генов с помощью ОТ-ПЦР в реальном времени на 7 и 14 сутки культивирования. Тотальную РНК выделяли с использованием лизирующего реагента QIAzol (Qiagen, США). Обратную транскрипцию осуществляли с помощью набора QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen, США). Полученную кДНК использовали для определения уровня экспрессии генов. Для нормализации уровня транскрипции в качестве хаускиппинг-гена использовали *HPRT1*. Количественную ПЦР-РВ проводили на приборе Mx3000P (Stratagene, США) с использованием SYBR Green 1 ПЦР-микс (Синтол, Россия).

Достоверность различий между группами оценивали с помощью критерия Манна–Уитни. Различия считали достоверными при $p < 0.05$.

Динамику транскрипционной активности оценивали по изменению экспрессии генов, характерных для ранних (транскрипционные факторы остерикс (*SP7*) и *RUNX2*) и поздних (остеокальцин – *BGLAP*, остеоопонтин – *SPP1*) стадий остеокomiteирования МСК, согласно [13]. Адипогенный потенциал оценивали по экспрессии генов, кодирующих продукты, характерные для раннего (транскрипционные факторы *C/EBPα*

(*CEBPA*) и *PPARγ* (*PPRG*) и позднего (адипонектин *ADIPOQ* адипокоммитирования [13].

В табл. 1 представлены результаты анализа транскрипционной активности генов, связанных с остеогенным коммитированием МСК. Экспрессия транскрипционных факторов в МСК между 7 и 14 сутками культивирования при 20% O_2 изменялась разнонаправленно: транскрипция *RUNX2* – достоверно увеличивалась, а *SP7* – снижалась. При 5% O_2 , напротив, экспрессия *RUNX2* не изменялась, тогда как *SP7* – существенно увеличивалась. *RUNX2* и остерикс являются ключевыми транскрипционными факторами остеогенной дифференцировки. *RUNX2* регулирует инициацию и развитие всех этапов остеокomiteирования. Остерикс контролирует экспрессию генов остеогенных белков по *RUNX2*-независимому пути. Предполагается, что транскрипционная активность этих двух факторов может быть разделена во времени, и остерикс контролирует более поздние фазы остеодифференцировки, связанные с продукцией матрикса, в который входят такие белки как коллаген I-го типа, остеоопонтин, остеоонектин, остеокальцин, костный сиалопротеин, фибронектин и др. [13]. Гены *BGLAP* и *SPP1*, кодирующие целевые остеогенные белки этих регуляторных молекул, демонстрировали существенное возрастание экспрессии только при “физиологической” гипоксии. По-видимому, при 5% O_2 *RUNX2*-независимая регуляция остеокomiteирования через *SP7* может вносить более значимый вклад в остеодифференцировку МСК.

Адиподифференцировка МСК находится под контролем ключевых регуляторов *PPARγ* и *C/EBPα*, β , δ . *C/EBPβ* и *C/EBPδ* являются мишенями адипогенных гормонов и, в свою очередь, контролируют *PPARγ* и *C/EBPα*. Активность *PPARγ* и *C/EBPα* координируется в процессе адипогенеза по механизму положительной обратной связи, обеспечивая увеличение экспрессии генов, продукты которых вовлечены в адипогенез, таких как адипонектин (*ADIPOQ*) – гормон, продуцируемый клетками жировой ткани [13]. При анализе транскрипции генов адиподифференцировки только в условиях “физиологической” гипоксии после 14 суток культивирования выявлено увеличение экспрессии транскрипционных факторов *CEBPA* и *PPRG*, а также “позднего” гена адиподифференцировки – *ADIPOQ*. При 20% O_2 транскрипция этих генов не изменялась или снижалась (табл. 1).

Таким образом, при культивировании в условиях “физиологической” гипоксии митотически неактивные МСК демонстрируют транскрипционный профиль, характерный для бипотентных ранних стромальных предшественников. Предполагается, что именно такие клетки будут более

Таблица 1. Экспрессия генов остео- и адиподифференцировки в МСК при различном уровне O₂

Стадии дифференцировки	Остео-/ Адипомаркеры	20% O ₂		5% O ₂	
		7 сутки	14 сутки	7 сутки	14 сутки
Остеогенные клетки-предшественники	SP7	5.4 ± 0.2	1.3 ± 0.9*	1.7 ± 0.2**	7.2 ± 0.9***
Преостеобласты	RUNX2	101.8 ± 0.3	227.1 ± 48.05*	164.9 ± 81.3**	122.8 ± 67.7
Зрелые остеобласты	BGLAP	12.3 ± 8.9	1.4 ± 0.7*	5.1 ± 1.2**	20.7 ± 1.8***
	SPP1	3.4 ± 0.8	2.4 ± 1.3	5.9 ± 0.6	54.8 ± 20.4***
Адипогенные клетки-предшественники	PPARG	2.6 ± 1.2	1.1 ± 0.1*	6.0 ± 2.7**	11.8 ± 3.2***
Преадипоциты	CEBPA	2.6 ± 1.3	0.4 ± 0.2*	5.1 ± 0.1**	14.4 ± 2.3***
Зрелые адипоциты	ADIPOQ	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.1	1.3 ± 0.3	2.9 ± 0.8***

Примечания. Данные нормализованы на значения экспрессии гена домашнего хозяйства *HPRT1* представлены как $M \pm SD$. * – Достоверное отличие от значения на 7 сутки эксперимента, при $p < 0.05$; ** – достоверное отличие от значения при 20% O₂, при $p < 0.05$

эффективно поддерживать *ex vivo* экспансию ГСПК.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-29-04026 и Программы фундаментальных исследований Президиума РАН № 18 “Фундаментальные исследования для биомедицинских технологий”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Caplan A. // Stem cells international. 2015. V. 2015. P. 6.
2. De Lima M., Mcniece I., Robinson S.N., et al. // N. Engl. J. Med. 2012. V. 367(24). P. 2305–2315.
3. Сотнезова Е.В., Андреева Е.Р., Григорьев А.И., Буравкова Л.Б. // Acta Naturae. 2016. Т. 8. № 3 (30). С. 6–18.
4. Fehrer C., Brunauer R., Laschober G., et al. // Aging cell. 2007. V. 6(6). P. 745–757.
5. Yang X., Cai X., Wang J., et al. // Cell Proliferation. 2012. V. 45. P. 158–166.
6. Buravkova L.B., Rylova Y.V., Andreeva E.R., et al. // Biochim Biophys Acta. 2013. V. 1830(10). P. 4418–4425.
7. Buravkova L.B., Andreeva E.R., Gogvadze V., et al. // Mitochondrion. 2014. V. 19. P. 105–112.
8. Andreeva E.R., Andrianova I.V., Sotnezova E.V. et al. // PLoS One. 2015. V. 10(4). e0124939.
9. Andreeva E., Andrianova I., Sotnezova E., et al. // J. Biosci. Bioeng. 2019. V. 127(5). P. 647–654.
10. Wu J., Zhang W., Ran Q., et al. // Stem cells international. 2018. V. 2018. P. 13.
11. Omatsu Y., Sugiyama T., et al. // Immunity. 2010. V. 33(3). P. 387–399.
12. Sugino N., Miura Y., Yao H., et al. // Biochemical and biophysical research communications. 2016. V. 469(4). P. 823–829.
13. Choi J.W., Shin S., Lee C.Y., et al. // Cellular Physiology and Biochemistry. 2017. V. 44(1). P. 53–65.

DIFFERENTIAL EXPRESSION OF BIPOTENT COMMITMENT-RELATED GENES IN MULTIPOTENT MESENCHYMAL STROMAL CELLS AT DIFFERENT O₂ LEVELS

Corresponding Member of the RAS L. B. Buravkova^{a, #}, M. I. Ezdakova^a, I. V. Andrianova^a, E. A. Golikova^a, and E. R. Andreeva^a

^a Institute of Biomedical Problems of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 123007 Russia

[#] e-mail: buravkova@imbp.ru

The transcriptomic profile associated with osteo- and adipodifferentiation in growth-arrested multipotent mesenchymal stromal cells (MSCs) from human adipose tissue was analyzed in vitro at 20% (standard laboratory) and 5% (tissue-related) O₂ levels. Compared with day 7, at 5% O₂ spontaneous upregulation of osteo- (RUNX2, SP7, BGLAP, SPP1) and adipodifferentiation (CEBPA, PPGA, ADIPOQ) genes in MSCs was observed on day 14 ($p < 0.05$). Thus, upon expansion under tissue-related O₂ MSCs demonstrated a bipotent transcriptomic profile, which can contribute to the improvement of their hematopoiesis-supportive function.

Keywords: multipotential mesenchymal stromal cells, commitment, gene expression