

ANALYSIS OF EFFECTS SOLUBIL FACTORS AND CELL-CELL INTERACTION OF NEURAL DIFERENCIATION

ANALÝZA ÚČINKŮ SOLUBILNÍCH FAKTORŮ A BUNĚČNÉ KOMUNIKACE NA NEURÁLNÍ DIFERENCIACI

Bílek K., Hampl A.

Ústav genetiky, Agronomická fakulta, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně,
Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika.

E-mail: kabyk@post.cz

ABSTRACT

This work was focused on the effects of cell-cell interaction for the differentiation of embryonal cells inducing especially retinoic acid. We did not demonstrate that EC P19 cells produce solubil factor, which stimulate neural differentiation. Even direct contact of cells with retinoic acid stimulated cells did not affect neural differentiation EC P19 cells. This work again contributes to the understanding of the mechanism of regulation of differentiation during early embryogenesis and are also applicable for modern manipulation with ES cells *in vitro*.

Keywords: differentiation, embryogenesis, embryoid bodies, monolayer, retinoic acid

ABSTRAKT

Tato práce byla zaměřena na analýzu účinků solubilních faktorů a buněčné komunikace během embryonální neurální diferenciaci v souvislosti s kyselinou retinovou. Záradečné buňky byly kultivovány v kondiciovaných médiích a na podkladových vrstvách buněk, které byly ošetřeny různými způsoby. Po analýze pokusů jsme dospěli k závěru, že buňky neprodukovaly solubilní faktory, které by stimulovaly neurální diferenciaci. Ani mezibuněčný kontakt nepodporoval diferenciaci neurálním směrem. Tato práce opět přispěla k porozumění mechanismů řídících diferenciaci během časné embryogeneze.

Klíčová slova: diferenciaci, embryogeneze, embryoidní tělíska, monolayer, kyselina retinová

ÚVOD

Pro simulaci embryonálního vývoje se v dnešní době široce používají buněčné kultury zárodečných kmenových buněk. Pomocí těchto kultur lze velice zjednodušeně sledovat děje na buněčné a molekulární úrovni, které se odehrávají během embryonálního vývoje a jsou jiným způsobem nezachytitelné. Embryonální kmenové buňky jsou pluripotentní, tzn. jsou

schopny dát vzniknout buňkám všech tří zárodečných listů a mají schopnost dále se diferencovat.

Pro diferenciaci buněk v tkáňové kultuře se běžně používají dva modely. Prvním je diferenciaci buněk v jednovrstevné kultuře tzv. monolayer, výhoda této kultivace spočívá v přímém kontaktu každé buňky s kultivačním médiem resp. s látkami rozpuštěnými v tomto médiu. Druhým způsobem je diferenciaci v podobě plovoucích trojrozměrných kolonií tzv. embryonálních tělískách (EB-embryoid bodies). Struktura EB se částečně podobá situaci, kterou prochází vnitřní buněčná masa (ICM-inner cell mass) v blastocystě během časného embryonálního vývoje, proto je tento model kultivace buněk vhodný pro studium časné embryogeneze jako probíhá *in situ*.

Pro vývoj savčích buněk je jednou z mnoha esenciálních látek vitamin A. Vitamin A je sám o sobě neúčinný a proto musí být metabolizován na některý z aktivních metabolitů. Jedním z těchto metabolitů je i kyselina retinová (RA-retinoic acid). Biologické účinky RA jsou v popředí zájmu mnoha laboratoří po celém světě včetně té naší, hlavním důvodem tohoto zájmu jsou její morfogenní, teratogenní a současně i protinádorové účinky v závislosti na buněčném typu, který je jejím působení vystaven.

Diferenciaci v jednovrstevné kultuře

Jak již bylo řečeno, prostřednictvím jednoduchých manipulací v jednovrstevné kultuře, jsme schopni docílit diferenciaci zárodečných buněk do mnoha buněčných typů. I zde existují dvě základní možnosti jak indukovat buněčnou diferenciaci. Induktory mohou být látky jednak přirozené např. cytokiny, hormony, vitaminy, atd. a nebo látky syntetického původu se kterými se buňka přirozeně nesetká jako je např. dimetyl sulfoxid, phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) aj. Buňky které jsou kultivovány jako jednovrstevná kultura v sérovém médiu si udržují svůj nediferencovaný stav. Pokud se do tohoto média přidá RA dochází k diferenciaci buněk ento- a mezodermálním směrem (Mummery *et al.*, 1986). Rozdílná situace nastává pokud sérové médium vyměníme za bezsérové. Darmon *et al.* již v roce 1981 objevil, že buněčná linie embryonálních karcinomových buněk C17-S1 diferencuje v bezsérovém médiu neurálním směrem, přičemž rychlost diferenciaci může být podpořena přidávkou RA (Tanaka *et al.*, 1992). Pacherník *et al.* (v tisku), který mimo jiné zjišťoval vliv koncentrace RA v bezsérovém médiu na rychlost diferenciaci zjistil, že až od koncentrace $5 \cdot 10^{-9}$ resp. $5 \cdot 10^{-8}$ mol/l se projevila vyšší akcelerace neurální diferenciaci v porovnání s buňkami kultivovanými jen v bezsérovém médiu. Dalším z faktorů působícím na diferenciaci buněk je také jejich hustota během kultivace, jak zjistil Berg a McBurney

(Berg a McBurney, 1990). Pozorovali rychlost diferenciaci buněk EC P19 v závislosti na koncentraci RA v médiu a hustotě buněk. Již 4 hodiny po indukci RA byla indukována nezvratná diferenciaci, také rychlost zvratu velice korelovala s hustotou buněk, kultivace buněk o vyšší hustotě vykazovali pomalejší diferenciaci v porovnání s kulturami o nízké hustotě. Také Schmidt *et al.* pozoroval diferenciaci buněk různé hustoty ovlivněných RA. Kultivace o tak nízké hustotě, kde nebyl ani mezibuněčný kontakt, nediferencovaly ani po indukci RA. Při kultivaci o vyšší hustotě s RA došlo k diferenciaci neurálním směrem (Schmidt *et al.*, 1992). Kawasaki *et al.*, 2000 identifikoval stromální buňky podporující neurální diferenciaci (SDIA-stromal cell-derived inducing activity), tyto buňky mají schopnost podporovat, jako podkladová vrstva, buňky v neurální diferenciaci aniž by byla nutná kultivace v EB nebo indukce RA.

Diferenciaci v embryoidních tělíscích

Embryonální zárodečné buňky pro vytvoření EB vyžadují v médiu přítomnost RA. U buněk kultivovaných v EB byla také prokázána rozdílná reakce na odstupňovanou koncentraci RA. EC P19 buňky vystavené nízké koncentraci RA 10^{-9} mol/l byly charakterizovány jako buňky srdeční svaloviny, při použití vyšší koncentrace 10^{-8} mol/l vzniká kosterní svalstvo, bylo však zjištěno také velké množství neuronů. Po ošetření buněk velmi vysokou dávkou RA od 10^{-7} do 10^{-5} mol/l vznikají buňky astroglální. Tento výsledek poukazuje na možný vliv koncentračního gradientu látek, jako jsou retinoidy (Edwards and McBurney, 1983). Ke stejnému výsledku dospěl i Jones-Villeneuve *et al.*, který ale také zjistil, že šestý den od iniciace EB RA v bezsérovém médiu začíná ubývat buněk, které vykazují neurální příslušnost. A naopak se zvyšuje se množství buněk, které exprimují markery pro jiné buněčné typy. Jedno z možných vysvětlení pro tuto skutečnost je, že neurony které jsou terminálně diferencované a nejsou již schopny mitózy, jsou nyní potlačovány buňkami, které byly v kultuře inhibovány RA a zachovaly si schopnost dělení. Tyto buňky přerůstají a stávají se v kultuře dominantní (Jones-Villeneuve *et al.*, 1982). Tento výsledek potvrzuje i McBurney *et al.*, který zjistil, že šestý den od iniciace RA exprimuje více jak 85 % buněk markery typické pro neurální diferenciaci (McBurney *et al.*, 1988).

Vlastní práce

Jako první byla položena hypotéza, zda faktory které buňky produkují do vnějšího prostředí (médiu) podporují diferenciaci. Pro testování naší hypotézy, jsme získali dva modely kondiciovaných médií, které nám vyprodukovaly buňky ovlivněné RA.

Druhá hypotéza se týkala otázky, zda mezibuněčný kontakt může mít vliv na diferenciaci neurálním směrem. Pro testování této hypotézy jsme použili buňky ovlivněné RA a následně mitoticky inhibované mitomicinem C (MMC-mitomicin) a nebo fixované formaldehydem (FA-formaldehyd). Tyto fixační látky jsme zvolili z důvodu rozdílného účinku na podkladovou vrstvu buněk. MMC inhibuje dělení buněk při zachování jejich životaschopnosti. Buňky po fixaci FA jsou „usmrceny“, ale jejich povrchové ligandy zůstávají dostatečně přístupné pro následně přisedlé buňky.

METODIKA

Kultivace buněk

Pro naše pokusy byla použita linie embryonálních karcinomových buněk stabilní linie s označením P19 (EC P19). Tato linie byla získána nákupem z buněčné banky (European Collection of Cell Culture, Wiltshire, GB) a jako nediferencované byly kultivovány na tkáňových miskách v kompletním sérovém médiu: DMEM (DMEM-Dulbecco's modified Eagle's medium) (PAA Laboratories, Linz, Austria) obsahující 10 % fetálního telecího séra (FCS-fetal calf serum) (PAA Laboratories, Linz, Austria), 0,05 mmol/ml β -mercaptoethanolu (Sigma, St. Louis, USA), 100 m. j./ml penicilinu (Gibco BRL, Chemos CZ, Praha, CZ) a 0,1 mg/ml streptomycinu (Gibco BRL, Chemos CZ, Praha, CZ). Před kultivací bylyisky ošetřeny 0,1% roztokem želatiny (Sigma, Praha, CZ).

Pro diferenciaci buněk, bylo použito medium bezsérové: DMEM/F12 1:1 (PAA Laboratories, Linz, Austria) s přidavkem inzulinu, transferinu, selenu (Gibco BRL, Chemos CZ, Praha, CZ), 100 m. j./ml penicilinu (Gibco BRL, Chemos CZ, Praha, CZ) a 0,1 mg/ml streptomycinu (Gibco BRL, Chemos CZ, Praha, CZ). Ošetření misek před kultivací viz. výše. Veškeré kultivace probíhaly v inkubátoru v atmosféře s obsahem 5% CO₂ při 37 °C.

Příprava kondiciovaných médií

Před kultivací byly tkáňovéisky standardně ošetřeny 0,1% roztokem želatiny, po adhezi EC P19 buněk na miskách (3 hodiny) bylo do DMEM média přidáno 0,5 μ mol/ml RA po dobu 48 hodin. Další postup při odběru kondiciovaných médií viz níže, model 1 a model 2.

Model 1: Poté byly buňky 2x 5 minut omyty fosfátovým pufrem (PBS) a převrstveny na 24 hodin čerstvým ITS médiem. Toto médium bylo považováno za kondiciované faktory produkovanými EC P19 buňkami indukovanými RA.

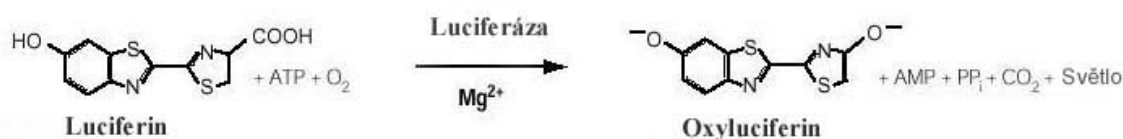
Model 2: Druhá alternativa kondiciovaného média je shodná s modelem 1, ale buňky byly po omytí PBS opět převrstveny DMEM médiem a po dobu 24 hodin, následně bylo

médium vyměněno za ITS médium na dalších 24 hodin, poté bylo považováno za kondiciované podobně jako u modelu 1.

Pro odstranění plovoucích buněk a jejich zbytků bylo odebrané médium odstředěno při 4000 otáčkách/min. A takto připravený supernatant byl použit jako kondiciované médium v následujících experimentech.

Měření koncentrace kyseliny retinové v kondiciovaných médiích

Pro měření RARE aktivity resp. koncentrace RA v kondiciovaných médiích byla použita stabilní linie EC P19/A15, která obsahuje pRARE β 2-TK-luc plazmid (darováno od Christopher Glass, University of California, San Diego, La Jolla, California, USA). Aktivita byla zjišťována pomocí kitu Luciferase Assay Systém (Promega, East Port Praha, Praha, CZ) v podobě intenzity vznikajícího světla měřeného citlivou fotobuňkou luminometru, vzorec reakce viz. obr. 3.1., dále dle návodu výrobce (www.promega.com [online], popsáno Pacherník *et al.*, 2002).



Obr. 4.1.: Vzorec reakce. (www.promega.com [online])

Příprava podkladové vrstvy buněk

Před kultivací EC P19 buněk byly misky standardně ošetřeny 0,1% roztokem želatiny. Po adhezi buněk (3 hodiny) bylo do DMEM média přidáno 0,5 μ mol/ml RA na 48 hodin. Poté následovaly dvě varianty ovlivnění buněk MMC a nebo FA. MMC jako inhibitor mitózy byl aplikován přímo do DMEM média na 2 hodiny v množství 100 ng/ml, následovalo omytí buněk 2x 5 minut v PBS a buňky byly převrstveny čerstvým DMEM médiem s nediferencovanými EC P19 buňkami. Po adhezi těchto buněk (3 hodiny) bylo DMEM médium vyměněno za ITS médium. Takto koncipovaná kultivace probíhala po dobu 5 dní.

Fixace pomocí FA. Buňky kultivované v DMEM s RA po dobu 48 hodin byly opláchnuty 2x 5 minut PBS a převrstveny novým PBS s 2% FA po dobu 15 minut. Opět následovalo 2x 5 minut omytí buněk v PBS a převrstvení čerstvým DMEM médiem s nediferencovanými EC P19 buňkami. Za 3 hodiny, po adhezi buněk, bylo DMEM médium vyměněno za ITS médium. Kultivace trvala shodně 5 dní.

Analýza Western blot

Sklízení buněk a příprava vzorků na western blot analýzu: Buňky byly 2x 5 minut omyty PBS a poté sklizeny lyzačním pufrem (1% SDS, 50 mmol/ml Tris-HCl, pH 7,5, 10% glycerol). Homogenizace vzorků byla podpořena sonikací ultrazvukem na přístroji Sonoplus (Bandelin Electronic, Berlin, SRN) a spektrofotometricky změřena koncentrace proteinů pomocí kitu DC Protein assay kit (Bio-Rad, Bio-Consult, Praha, CZ) při vlnové délce 690 nm. Vzorky byly rozředěny na jednotnou koncentraci 0,5 µg proteinu na µl, doplněny bromfenolovou modří (BFB, výsledná koncentrace 0.01%) a beta-merkaptoetanolem (výsledná koncentrace 1%). Elektroforéza v SDS-polyakrylamidovém gelu: Vzorky o celkovém množství 5 µg proteinu vzorku byly nanесeny na 10% akrylamidový gel pro SDS-PAGE (SDS-PAGE-sodium dodecyl sulphate – polyakrilamid gel). Po rozdělení v gelu byly jednotlivé proteiny přeneseny přesávkou v elektrickém poli na PVDF membránu (PVDF-polyvinyl difluoride membrane) (Immobilon-P, Sigma, Praha, CZ). Imunodetekce jednotlivých proteinů. PVDF membrána s přenesenými proteiny byla inkubována 1 hodinu v 5% roztoku odtučněného mléka z důvodu vyblokování jednotlivých nespecifických míst. Následovala inkubace s primární protilátkou (10 hodin) při 4 °C. Poté byly membrány oplachovány 5x 10 minut v omývacím pufru (10 mmol Tris-HCl pH 7,4, 150 mmol NaCl, 0,05% TWEEN 20), následovala inkubace s příslušnou sekundární protilátkou (1 hodinu) a opět oplachování membrány 5x 10 minut v omývacím pufru.

Vizualizace detekovaných proteinů byla provedena pomocí kitu ECL+Plus reagent (Amersham Pharmacia Biotech, Praha, CZ) a signál exponován na negativní film značky Agfa.

Proteiny jejichž exprese byla sledována

βIII-tubulin – je neuron-specifická izoforma β-tubulinu. Tato izoforma tubulinu byla prokázána u neuronů, nervových vláken a gangliových buněk (Draberová *et al.*, 1998), byl použit, jako marker neurální diferenciaci.

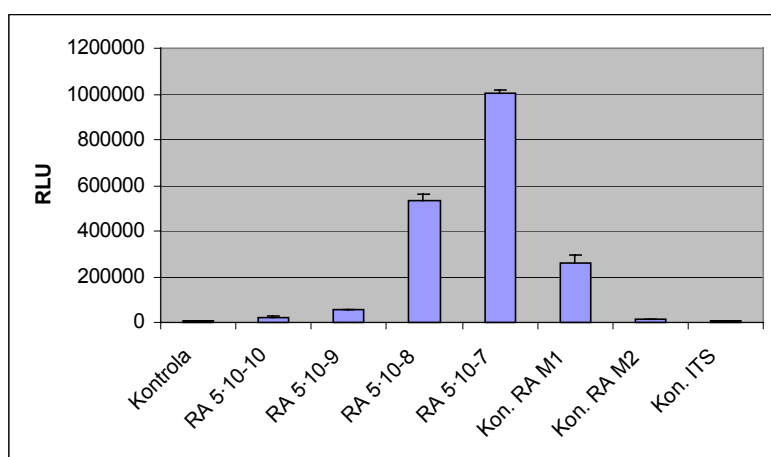
N-CAM – nerve-cell adhesion molecule. Jak název říká, rodina těchto proteinů je velmi důležitá pro nervovou tkáň. Objevují se při začátku morfogeneze nervové tkáně, rovnoměrně rozdělené podél neurální trubice. Začnou-li nervové buňky migrovat, N-CAM vymizí, ale opět se objeví, když migrace ustane a objeví se ganglia (Masopust *et al.*, 2003 [online]).

p27 – exprese proteinu p27 se zvyšuje s neurální diferenciací (Bryja, 2004).

VÝSLEDKY A DISKUZE

Analýza účinků solubilních faktorů na neurální diferenciaci

Naše výsledky poukazovaly, že model 1 kondiciovaného média měl pozitivní vliv na diferenciaci neurálním směrem, jak bylo detekováno na změnách exprese neurálních markerů (N-CAM, β III-tubulin, p27). Toto médium bylo odebráno přímo z buněk, které byly ovlivněny RA, bez 24 hodinové prodlevy. Kondiciované médium, které bylo připraveno s 24 hodinovou prodlevou před odebráním kondiciovaného média (model 2), na diferenciaci vliv nemělo. Po provedení měření RARE aktivity resp. koncentrace RA v kondiciovaných médiích prostřednictvím reportérové linie (Pacherník *et al.*, v tisku) jsme zjistili, že kondiciované médium v případě modelu 1 mělo schopnost více jak stonásobně indukovat RARE aktivitu u použité reportérové linie než kondiciované médium modelu 2, kdy je schopnost indukce RARE aktivity srovnatelná s kontrolním vzorkem a tedy vlastním pozadím této detekce viz graf 1. Tento více jak stonásobný rozdíl v RARE aktivitě, který se projevil jak změnou morfologie buněk během kultivace, tak expresí proneurálních markerů, odpovídá přibližně přítomnosti $1 \cdot 10^{-8}$ mol/l RA v médiu. Tento výsledek se shoduje s předešlými pracemi (Tanaka *et al.*, 1992, Pacherník *et al.*, 2002), které ukazují, že rychlost neurální diferenciaci může být podpořena RA. Námi naměřená koncentrace RA v kondiciovaném médiu (model 1) je koncentrace, která je již sama schopna indukovat neurální diferenciaci u EC P19. Toto posílení neurální diferenciaci je koncentračně závislé v rozsahu koncentrací od koncentrace $5 \cdot 10^{-9}$ resp. $5 \cdot 10^{-8}$ mol/l po $5 \cdot 10^{-6}$ mol/l RA v porovnání s buňkami kultivovanými jen v bezsérovém médiu (Pacherník *et al.*, v tisku).



Graf 1.: Výsledky měření kondiciovaných médiích pomocí reportérové linie. Na ose „y“ je znázorněno relativní množství světla (RLU-relative light units) vyprodukované reakcí luciferinu a luciferázy. Na ose „x“ jsou znázorněny jednotlivé kombinace.

Analýza účinku mezibuněčné komunikace na neurální diferenciaci

Po provedení analýz, které nám měly odhalit odpověď na naši druhou hypotézu, jsme dospěli k závěru, že ani buňky podkladové vrstvy indukované RA nemají schopnost akcelarovat neurální diferenciaci u nediferencovaných buněk, jak se to podařilo např. Kawasaki *et al.* (Kawasaki *et al.*, 2000). Ten identifikoval stromální buňky podporující neurální diferenciaci (SDIA-stromal cell-derived inducing activity), tyto buňky mají schopnost podporovat, jako podkladová vrstva, buňky v neurální diferenciaci aniž by byla nutná kultivace v EB nebo indukce RA a tuto vlastnost si zachovávají i po fixaci 4% formaldehydem. Význam vzájemných mezibuněčných kontaktů i pro *in vitro* indukovanou diferenciaci EC buněk dokumentují práce studující působení hustoty buněk na jejich diferenciaci během kultivace. Kultivace o nízké hustotě, kde nebyl ani mezibuněčný kontakt, nediferencovaly ani po indukci RA. Při kultivaci o vyšší hustotě s RA došlo k diferenciaci neurálním směrem (Berg a McBurney, 1990; Schmidt *et al.*, 1992).

ZÁVĚR

První část experimentů zahrnovala ověřování vlivu solubilních faktorů na neurální diferenciaci pomocí kondiciovaných médií. Podařilo se nám zjistit, že na diferenciaci buněk neměly vliv neznámé solubilní faktory v kondiciovaných médiích, ale samotná přítomnost RA, pravděpodobně uvolněná z indukovaných buněk.

Zkoumáním vlivu mezibuněčného kontaktu se nám nepodařilo prokázat, že by kultivace buněk indukovaných RA a mitoticky inhibovaných MMC nebo fixovaných FA měla schopnost podpořit neurální diferenciaci buněk následně vyšetých.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Berg R. W., McBurney M. W., 1990: Cell density and cell cycle effects on retinoic acid-induced embryonal carcinoma cell differentiation. *Dev. Biol.*, Mar 138(1): 123-135.
- Bryja V., 2004: Regulátory buněčného cyklu v neurální diferenciaci a v diferenciaci buněk obecně. Ústav experimentální medicíny AV ČR, Laboratoř molekulární embryologie, Doktorská dizertační práce: 48.
- Draberova E., Lukas Z., Ivanyi D., Viklicky V., Draber P., 1998: Expression of class III beta-tubulin in normal and neoplastic human tissues. *Histochem Cell Biol.*, Mar 109(3): 231-239.

Edwards M. K., McBurney M. W., 1983: The concentration of retinoic acid determines the differentiated cell types formed by a teratocarcinoma cell line. *Dev Biol.*, Jul 98(1): 187-191.

Jones-Villeneuve E. M., McBurney M. W., Rogers K. A., Kalnins V. I., 1982: Retinoic acid induces embryonal carcinoma cells to differentiate into neurons and glial cells. *J Cell Biol.*, Aug 94(2): 253-262.

Kawasaki H., Mizuseki K., Nishikawa S., Kaneko S., Kuwana Y., Nakanishi S., Nishikawa S. I., Sasai Y., 2000: Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by stromal cell-derived inducing activity. *Neuron*, Oct 28(1): 31-40.

McBurney M. W., Reuhl K. R., Ally A. I., Nasipuri S., Bell J. C., Craig J., 1988: Differentiation and maturation of embryonal carcinoma-derived neurons in cell culture. *J Neurosci.*, Mar 8(3): 1063-1073.

Mummery C. L., Feijen A., Moolenaar W. H., van den Brink C. E., de Laat S. W., 1986: Establishment of a differentiated mesodermal line from P19 EC cells expressing functional PDGF and EGF receptors. *Exp Cell Res.*, Jul;165(1): 229-242.

Pacherník J., Bryja V., Ešner M., Kubala L., Dvořák P., Hampl A., in press: Neural differentiation of pluripotent mouse embryonal carcinoma cells by cetinoid acid – inhibitory effect of serum. *Neural*, Pachernik J., Esner M., Bryja V., Dvorak P., Hampl A., 2002: Neural differentiation of mouse embryonic stem cells grown in monolayer. *Reprod Nutr Dev.*, Jul-Aug 42(4): 317-326.

Schmidt J. W., Brugge J. S., Nelson W. J., 1992: Pp60src tyrosine kinase modulates P19 embryonal carcinoma cell fate by inhibiting neuronal but not epithelial differentiation. *J Cell Biol.*, Feb 116(4): 1019-1033.

Tanaka Y., Kawahata K., Nakata T., Hirokawa N., 1992: Chronological expression of microtubule-associated proteins (MAPs) in EC cell P19 after neuronal induction by retinoic acid. *Brain Res.*, Nov 20; 596(1-2): 269-278.

Internetové zdroje:

Internetové stránky společnosti Promega Corporation [noline], 2004, [citováno 1. 4. 2004], dostupné na WWW: <<http://www.promega.com/tbs/tb281/tb281.pdf>>

Masopust J., Bartůňková J., Goetz P., Chromý V., Jabor A., Jirásek J. E., Mareš J., Palička V., Pelouch V., Průša R., Štern P., Zima T., *Patobiochemie buňky.*, Univerzita Karlova v Praze [online], 2003, [citováno 10. 3. 2004], dostupný na WWW: <<http://www.zdravcentra.cz/?act=k-10&did=337>>