Special Article

Regulation of Stem Cell Fate in Hematopoietic Development

Wilairat Leeanansaksiri PhD*,**,
Chavaboon Dechsukhum MD, PhD***

** Research Center for Transplantation and Gene Therapy Technology, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima*
*** School of Microbiology, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima*
**** Department of Pathology, Faculty of Medicine, Prince of Songkla University, Hat yai, Songkhla*

Stem cells are broadly classified into two categories; embryonic stem cell and somatic stem cell. Both types of stem cells can be differentiated into many cell types of the body with a different capability. Blood cells are examples of the cells that can be derived from both embryonic and somatic stem cells, both in vivo and in vitro. In adults, blood cells are mainly derived from hematopoietic stem cells (HSC) in the bone marrow. HSC growth and differentiation is tightly regulated which require both intrinsic and extrinsic signals. In this regard, transcription factors are critical for the development of HSC and specific cell lineages, in part, by regulating the expression of hematopoietic growth factor (HGF) receptors, other transcription factors and lineage specific genes transcription. This review will focus on the role of Id transcription factors in stem cell fate regulation.

Keywords: *Stem cell fate regulation, Id transcription factor, Embryonic stem cell, Hematopoietic stem cell, Id1*

J Med Assoc Thai 2006; 89 (10): 1788-97
Full text. e-Journal: *http://www.medassocthai.org/journal*

The adult hematopoiesis system is a series of cellular processes whereby short-lived mature blood cells are continuously replenished from a pool of rare pluripotential hematopoietic stem cells (HSC)[1-3]. Embryonic origin of the hematopoietic cells is mesodermal germ layer. Hematopoietic stem cells exist in several areas during development including aorta-gonads-mesonephros (AGM), yolk sac, fetal liver, umbilical cord blood, bone marrow and peripheral blood. Adult hematopoietic development occurs by the sequential commitment of HSC into multi-potential progenitors that give rise to more committed or restricted precursor cells and finally into terminally differentiated blood cells including red blood cells, platelets, T cells, B cells, NK cell, mast cells, basophiles, eosinophils, neutrophils, monocytes and dendritic cells. While significant progress has been made in the purification of HSC/progenitor cells, questions regarding the molecular mechanism(s) that regulate self-renewal, lineage commitment and differentiation remain central to hematopoiesis. In this regard, transcription factors are critical for the development of HSC (e.g. Scl/Tal1, Aml1/Runx1, and c-Myb), and specific cell lineages (GATA-1/erythroid, Pu.1/myeloid and lymphoid, and C/EBPa/myeloid), in part, by 1) regulating the expression of hematopoietic growth factor (HGF) receptors 2) regulating other transcription factors 3) regulating lineage specific genes transcription[4-10]. Targeted disruption of these genes results in impaired hematopoietic development or defects in the development of specific cell lineages. Finally, transcription factors are frequently deregulated in leukemias, which results in enhanced cell proliferation and the inability of these cells to undergo terminal differentiation[5-7,11-16].

Correspondence to : Leeanansaksiri W, School of Microbiology, Institute of Science, Suranaree University of Technology, 111 University Avenue, Nakhon Ratchasima 30000, Thailand. Phone: 044-224-628, Fax: 044-224-633, E-mail: wilairat @sut.ac.th

Id Transcription factors

Inhibitor of DNA-binding protein (Id) category is a member of helix-loop-helix (HLH) transcription factor family. There are four Id proteins, Id1-Id4, have been described so far. Id1-Id3 are expressed in hematopoietic cells and Id4 is expressed in non hematopoietic

cells. Id proteins lack a basic (b) DNA-binding domain found in other HLH proteins. The basic region of each protein is required for DNA binding at specific sequence motif known as the E-box (CANNTG) or the related N-box (CACNAG)[17-20]. Therefore, Id proteins lack ability to bind DNA directly. However, Id proteins can regulate target gene expression[21,22], and function as dominant negative regulators of bHLH protein activity by forming inactive heterodimers with bHLH transcription factors such as E2A, HEB, MyoD and SCL rendering them unable to bind DNA as homodimer or heterodimer.

Expression of Id transcription factors in embryonic stem cells, hematopoietic stem cells, hematopoietic progenitors and differentiated hematopoietic cells

Id transcription factors regulate the growth and differentiation of a number of cell types[23-31]. In hematopoietic cells differentiation from embryonic stem (ES) cell in vitro model revealed that Id1, Id2, Id3, Id4 transcripts were low expressed in ES and embryoid body (EB) stages. Id1, Id3 and Id4 genes were down-regulated during the development of blast cell colonies while Id2 was maintained[32]. In this regard, Id1, Id3 and Id4 are considered as candidates for being negative regulators during early hematopoiesis from ES cell to blast cell stages. Id proteins expression profile of HSC and hematopoietic progenitors has been observed [33]. Low level or no Id1, Id2 transcripts were detected in purified HSC by real-time PCR method. Based on the same method, these transcripts were increased in common myeloid progenitors (CMP) and further increased in granulocyte/macrophage progenitors (GMP) suggesting that the expression of Id1 and Id2 increase during normal myeloid progenitor cell maturation. On the other hand, Id1 transcripts were decreased in megakaryocyte/erythroid progenitors (MEP) compared to CMP and, Id1 protein is expressed at low levels in erythroid cells suggesting that Id1 level was decreased and remained low during erythroid cell development. Furthermore, common lymphoid progenitors (CLP) express low levels of Id1 and Id2 and purified B and T cells express little or no Id1 protein indicating that Id1 levels remain low during lymphoid development. Id3 transcript was undetectable in purified HSC. Id4 was undetectable in HSC and during hematopoietic development from HSC. In other studies, Id1 mRNA expression was detected in committed hematopoietic progenitors but not in more primitive multi-potential progenitor cells[34]. In addition, while Id1 expression correlated with a state of cell growth, Id2 expression correlated with a state of quiescence and increased cell differentiation in hematopoietic cells[35-37].

Id proteins also are differential expressed in differentiated progeny of hematopoietic progenitors[33]. Id1 protein is expressed at low levels in unfractionated bone marrow cells (BMC) and FACS purified Gr-1$^+$-granulocytes, while little or no Id1 is detected in purified TER119$^+$-erythroid cells, and B220$^+$-B cells isolated from BMC. However, Id expression is greatly increased in progenitor-enriched (lineage-low, Lin^{lo}) BMC (~1% of total BMC), the BMC fraction that contains the myeloid progenitor (MPRO)-like progenitors. In lymphoid subsets in the spleen, Id1 protein is weakly expressed in unfractionated spleen cells, purified B220$^+$-B cells and CD3$^+$-T cells. Thus, Id1 is highly expressed in progenitor enriched BMC, is decreased in purified granulocytes, and is expressed at low levels in erythroid and lymphoid lineages. Id1 is down-modulated during the final stages of granulocyte maturation, but remains elevated in terminally differentiated macrophages suggesting that high levels of Id1 may be required to promote macrophage differentiation.

Id genes also are differentially expressed in multi-potential erythroid myeloid lymphoid (EML) cells, which closely resemble normal HSC, and MPRO cells that resemble more committed myeloid progenitors that are roughly 40 hours further along in differentiation[38,39]. The expression profile of Id1 was investigated in these 2 cell types[33] and revealed that 1) low levels of Id1 were detected in EML cells, while higher levels were present in MPRO cells 2) Id1 expression is induced by IL-3 in EML cells during myeloid cell differentiation 3) Id1 expression was unable to induce by cytokines that promote B cell or erythroid cell differentiation. These data indicate that expression of Id1 and Id2 may be regulated in HSC during early myeloid development.

Id1 as an intracellular regulator of hematopoietic stem cell fate

Questions remained as to whether cell fate decisions during hematopoietic development are the result of internally driven programs or environmental instructive signals[9,40]. For example, does HGF determine cell fate or are they permissive for survival of certain cell lineages? One of the answers can be driven from a study on regulation of HSC cell fate decision by Id1 that has been observed both in vitro and in vivo[33]. Over-expression of Id1 in EML cells blocked the erythroid potential but promoted myeloid potential of this cell line in vitro. Thus, regulation of Id1 in EML cells

could instruct the cells toward myeloid versus erythroid cell fate. According to EML cells have differentiation capability to various blood cell types as HSC, therefore, regulation of Id protein levels in HSC could instruct the cells toward CMP and then toward a myeloid (GMP) versus erythroid (MEP) cell fate. The in vivo effect of Id1 on long-term reconstitution activity of HSC has been investigated in a mouse model[33]. HSC populations have been isolated and infected with retroviral vectors expressing Id1 followed by transplantation into lethally irradiated mice. After 4-6 months of transplantation, the result revealed that over expression of Id1 in HSC promoted myeloid development but impaired erythroid and B cell development in vivo. This is supported by other studies demonstrating that transgenic mice which over-express Id1 in the B cell lineage show impaired B cell development at the pro-B cell stage[41,42]. In addition, over-expression of Id1 in mouse erythroleukemia (MEL) cells inhibits erythroid differentiation, and Id1 is down- modulated during the terminal erythroid differentiation[21,43,44]. In comparison, while over-expression of Id1 does not affect the early stages of myeloid development, high levels of Id1 inhibit the final stages of granulocyte but not macrophage differentiation[33]. Thus, in addition to its effects on the early stages of myeloid versus erythroid or lymphoid development, Id1 may also be a part of a mechanism regulating the final choice between macrophage and neutrophil development as shown in Fig. 1.

In summary, increasing levels of Id1 expression could promote 1) myeloid versus lymphoid lineage commitment of HSC, 2) myeloid versus erythroid cell development at the CMP stage and 3) macrophage versus a granulocyte cell fate in committed granulocyte/macrophage progenitors.

References

1. Spangrude G J, Smith L, Uchida N, Ikuta K, Heimfeld S, Friedman J, et al. Mouse hematopoietic stem

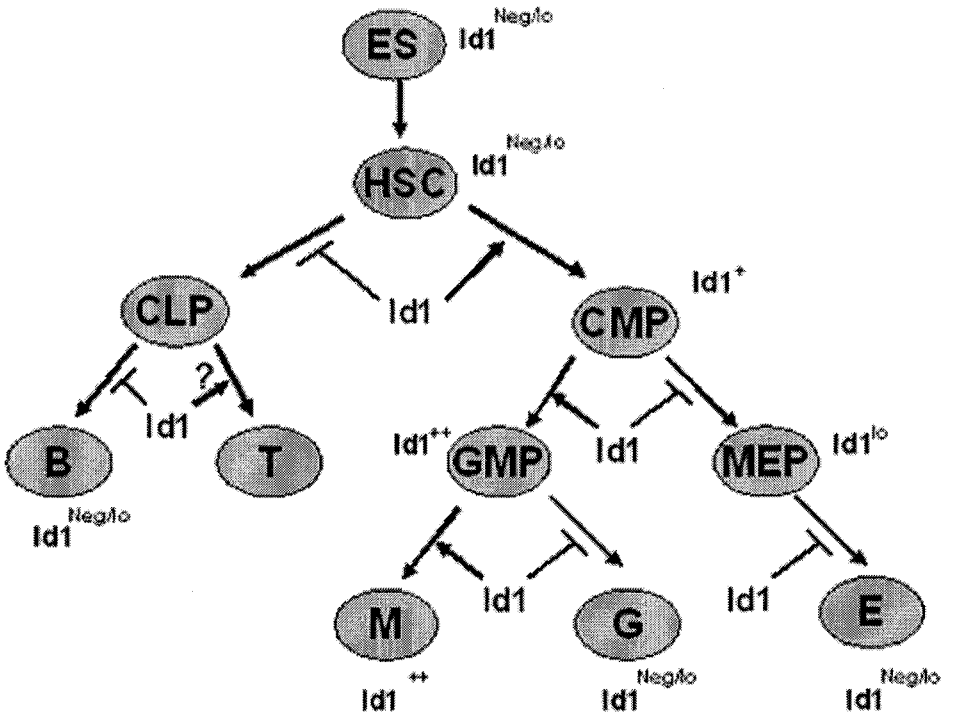

Fig 1. Summary schematic of Id1 expression and cell fate regulation in hematopoietic development. Regulation of Id1 expression in stem cells could instruct stem cells toward myeloid cell fate versus erythroid and lymphoid cell fates. ES = embryonic stem cell, HSC = hematopoietic stem cell, CLP = common lymphoid progenitors, CMP = common myeloid progenitor, MEP = megakaryocyte/erythrocyte progenitor, GMP = granulocyte/monocyte progenitor, B = B-cell, T = T-cell, M = macrophage, G = granulocyte, E = erythrocyte

cells. Blood 1991; 78: 1395-402.
2. Morrison SJ, Uchida N, Weissman IL. The biology of hematopoietic stem cells. Annu Rev Cell Dev Biol 1995; 1: 35-71.
3. Kondo MA, Wagers J, Manz MG, Prohaska SS, Scherer DC, Beilhack GF, et al. Biology of hematopoietic stem cells and progenitors: Implications for Clinical Application. Annu Rev Immunol 2003; 21: 759-806.
4. Zhang DE, Hohaus S, Voso MT, Chen HM, Smith LT, Hetherington CJ, et al. Function of PU.1 (Spi-1), C/EBP, and AML1 in early myelopoiesis: regulation of multiple myeloid CSF receptor promoters. Curr Top Microbiol Immunol 1996; 211: 137-47.
5. Tenen DG, Hromas R, Licht JD, Zhang DE. Transcription factors, normal myeloid development, and leukemia. Blood 1997; 90: 489-519.
6. Ward AC, Loeb DM, Soede-Bobok A, Touw IP, Friedman AD. Regulation of granulopoiesis by transcription factors and cytokine signals. Leukemia 2000; 14: 973-90.
7. Tenen DG. Disruption of differentiation in human cancer: AML shows the way. Nat Rev Cancer 2003; 3: 89-101.
8. Nagamura-Inoue T, Tamura T, Ozato K. Transcription factors that regulate growth and differentiation of myeloid cells. Int Rev Immunol 2001; 20: 83-105.
9. Zhu J, Emerson SG. 2002. Hematopoietic cytokines, transcription factors and lineage commitment. Oncogene 2002; 21: 3295-313.
10. Lecuyer E, Hoang T. SCL: from the origin of hematopoiesis to stem cells and leukemia. Exp Hematol 2004; 32: 11-24.
11. Downing JR. The core-binding factor leukemias: lessons learned from murine models. Curr Opin Genet Dev 2003; 13:48-54.
12. Kelly LM, Gilliland, DG. Genetics of myeloid leukemias. Annu Rev Genomics Hum Genet 2002; 3: 179-98.
13. Krug UA, Ganser A, Koeffler HP. Tumor suppressor genes in normal and malignant hematopoiesis. Oncogene 2002; 21: 3475-95.
14. Lin RJ, Sternsdorf T, Tini M, Evans RM. Transcriptional regulation in acute promyelocytic leukemia. Oncogene 2001; 20: 7204-15.
15. Lorsbach RB, Downing JR. The role of the AML1 transcription factor in leukemogenesis. Int J Hematol 2001; 74: 258-65.
16. Scandura JM, Boccuni P, Cammenga J, Nimer SD. Transcription factor fusions in acute leukemia: variations on a theme. Oncogene 2002; 21: 3422-44.
17. Ephrussi A, Church GM. Tonegawa S, Gilbert W. B lineage - specific interactions of an immunoglobulin enhancer with cellular factors in vivo. Science 1985; 227: 134-40.
18. Kiledjian M, Su LK, Kadesch T. Identification and characterization of two functional domains within the murine heavy-chain enhancer. Mol Cell Biol 1988; 8: 145-52.
19. Lassar AB, Buskin JN, Lockshon D, Davis RL, Apone S, Hauschka SD, et al. MyoD is a sequence-specific DNA binding protein requiring a region of myc homology to bind to the muscle creatine kinase enhancer. Cell 1989; 58: 823-31.
20. Tietze K, Oellers N, Knust E. Enhancer of splitD, a dominant mutation of Drosophila, and its use in the study of functional domains of a helix-loop-helix protein. Proc Natl Acad Sci USA 1992; 89: 6152-6.
21. Cooper CL, Brady G, Bilia F, Iscove NN, Quesenberry PJ. Expression of the Id family helix-loop-helix regulators during growth and development in the hematopoietic system. Blood1997; 89: 3155-65.
22. Weiler SR, Gooya JM, Ortiz M, Tsai S, Collins SJ, Keller JR. D3: a gene induced during myeloid cell differentiation of Linlo c-Kit+ Sca-1(+) progenitor cells. Blood 1999; 93: 527-36.
23. Zebedee Z, Hara E. Id proteins in cell cycle control and cellular senescence. Oncogene 2001; 20: 8317-25.
24. Benezra R, Rafii S, Lyden D. The Id proteins and angiogenesis. Oncogene 2001; 20: 8334-41.
25. Andres-Barquin PJ, Hernandez MC, Israel MA. Id genes in nervous system development. Histol Histopathol 2000; 15: 603-18.
26. Coppe JP, Smith AP, Desprez PY. Id proteins in epithelial cells. Exp Cell Res 2003; 285: 131-45.
27. Tzeng SF. Inhibitors of DNA binding in neural cell proliferation and differentiation. Neurochem Res 2003; 28: 45-52.
28. Yokota Y. Id and development. Oncogene 2001; 20: 8290-8.
29. Engel I, Murre C. The function of E- and Id proteins in lymphocyte development. Nat Rev Immunol 2001; 1: 193-9.
30. Massari ME, Murre C. Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms. Mol Cell Biol 2000; 20: 429-40.
31. Kreider BL, Benezra R, Rovera G, Kadesch T. Inhibition of myeloid differentiation by the helix-loop-helix protein Id. Science 1992; 255: 1700-2.

32. Nogueria MT, Mitjavila-Garcia F, Le pesteur MD, Filippi W, Vainchenker A, Kupperschmitt, et al. Regulation of Id gene expression during embryonic stem cell-derived hematopoietic differentiation. Biochem Biophy Res Com 2000; 276: 803-12.
33. Leeanansaksiri W, Wang H, Gooya JM, Renn K, Abshari M, Tsai S, et al. IL-3 induces inhibitor of DNA-binding protein-1 in hematopoietic progenitor cells and promotes myeloid cell development. J Immunol 2005; 174: 7014-21.
34. Church GM, Gilbert W. Genomic sequencing. Proc Natl Acad Sci USA 1984; 81: 1991-5.
35. Hasskarl J, Munger K. Id proteins - tumor markers or oncogenes? Cancer Biol Ther 2002; 1: 91-6.
36. Sikder HA, Devlin MK, Dunlap S, Ryu B, Alani RM. Id proteins in cell growth and tumorigenesis. Cancer Cell 2003; 3: 525-30.
37. Yokota Y, Mori S. Role of Id family proteins in growth control. J Cell Physiol 2002; 190: 21-8.
38. Tsai S, Collins SJ. A dominant negative retinoic acid receptor blocks neutrophil differentiation at the promyelocyte stage. Proc Natl Acad Sci USA 1993; 90: 7153-57.
39. Tsai S, Bartelmez S, Sitnicka E, Collins S. Lymphohematopoietic progenitors immortalized by a retroviral vector harboring a dominant-negative retinoic acid receptor can recapitulate lymphoid, myeloid, and erythroid development. Genes Dev 1994; 8: 2831-41.
40. Georgopoulos K. Haematopoietic cell-fate decisions, chromatin regulation and ikaros. Nat Rev Immunol 2002; 2: 162-74.
41. Sun XH. Constitutive expression of the Id1 gene impairs mouse B cell development. Cell 1994; 79: 893-900.
42. Hirayama F, Ogawa M. Negative regulation of early T lymphopoiesis by interleukin-3 and interleukin-1 alpha. Blood 1995;86:4527-31.
43. Hirayama F, Clark SC, Ogawa M. Negative regulation of early B lymphopoiesis by interleukin 3 and interleukin 1 alpha. Proc Natl Acad Sci USA 1994; 91: 469-73.
44. Matsunaga T, Hirayama F, Yonemura Y, Murray R, Ogawa M. Negative regulation by interleukin-3 (IL-3) of mouse early B-cell progenitors and stem cells in culture: transduction of the negative signals by betac and betaIL-3 proteins of IL-3 receptor and absence of negative regulation by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. Blood 1998; 92: 901-7.

การควบคุมการตัดสินใจของเซลล์ต้นกำเนิดในระบบการเจริญเติบโตของเซลล์เม็ดเลือด

วิไลรัตน์ ลื้อนันต์ศักดิ์ศิริ, ชวบูลย์ เดชสุขุม

เซลล์ต้นกำเนิดสามารถแบ่งออกอย่างกว้างๆได้เป็นสองประเภทตามแหล่งที่มาของเซลล์ได้แก่ เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนและเซลล์ต้นกำเนิดโซมาติก เซลล์ต้นกำเนิดทั้งสองประเภทนี้สามารถเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ชนิดต่าง ๆ ในร่างกายได้โดยมีขีดความสามารถที่แตกต่างกัน ตัวอย่างหนึ่งของเซลล์ที่สามารถเปลี่ยนแปลงมาจากเซลล์ต้นกำเนิดทั้งสองชนิดนี้ได้ทั้งในร่างกายที่มีชีวิตและในหลอดทดลอง ได้แก่เซลล์ชนิดต่าง ๆ ของระบบเลือด เซลล์เม็ดเลือดในผู้ใหญ่ส่วนมากมีการพัฒนามาจากเซลล์ต้นกำเนิดในไขกระดูก ซึ่งการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ต้นกำเนิดนี้ได้ถูกควบคุมเป็นอย่างดีโดยปัจจัยต่าง ๆ จากทั้งภายในเซลล์และภายนอกเซลล์ ซึ่งปัจจัยที่สำคัญเป็นอย่างยิ่งได้แก่ transcription factor ซึ่งทำหน้าที่ควบคุมการเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิดในไขกระดูก และการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ต้นกำเนิดเป็นเซลล์ชนิดอื่นๆ บทบาทที่สำคัญของ transcription factor ได้แก่ การควบคุมการแสดงออกของตัวรับบนผิวเซลล์ต่อสารกระตุ้นการเจริญเติบโตที่เซลล์ได้รับ การควบคุมการแสดงออก และการทำงานของ transcription factor ชนิดอื่น ๆ รวมทั้งการควบคุมกระบวนการการแสดงออกของจีนที่จำเพาะต่อการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ต้นกำเนิดเป็นเซลล์ชนิดที่จำเพาะเจาะจง โดยบทความนี้จะมุ่งเน้นถึงบทบาทของ transcription factor ที่ควบคุมการตัดสินใจของเซลล์ต้นกำเนิดที่จะเจริญไปเป็นเซลล์เม็ดเลือดชนิดต่าง ๆ ในระบบเลือด

กระบวนการกำเนิดของระบบเลือดในผู้ใหญ่เป็นกระบวนการของเซลล์ที่เกิดขึ้นอย่างเป็นลำดับขั้นตอนโดยที่เซลล์ชนิดต่าง ๆ ของเม็ดเลือดจะมีการเพิ่มจำนวนและเปลี่ยนแปลงมาจากเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดที่มีอยู่อย่างจำนวนจำกัดและเจริญเติบโตต่อไปจนกระทั่งเป็นเซลล์เต็มวัย เซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดเจริญเติบโตมาจากเนื้อเยื่อชั้น mesoderm ของตัวอ่อน ซึ่งเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดนี้สามารถพบได้ในหลายแหล่งในระหว่างการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิต ได้แก่ aorta-gonads-mesonephros (AGM), yolk sac, ตับของตัวอ่อน เลือดจากสายสะดือ ไขกระดูก และกระแสเลือด การเจริญเติบโตของระบบเลือดในผู้ใหญ่เกิดขึ้นจากการตัดสินใจของเซลล์อย่างเป็นลำดับที่แน่นอน โดยเริ่มจากเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดถูกกำหนดให้เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ต้นแบบชนิดที่สามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์เม็ดเลือดชนิดต่าง ๆ ได้หลายสาย จนกระทั่งพัฒนาเป็นเซลล์ต้นแบบที่มีความจำเพาะเจาะจงมากขึ้นว่าจะ เจริญต่อไปเป็นเซลล์เม็ดเลือดสายใด จากนั้นเซลล์ต้นแบบเหล่านี้จะเจริญต่อไปจนได้เซลล์เม็ดเลือดตัวเต็มวัยแต่ละชนิดในท้ายที่สุด ซึ่งได้แก่ เซลล์เม็ดเลือดแดง เกล็ดเลือด เซลล์ที เซลล์บี เซลล์เอ็นเค เซลล์มาสท์ เบโซฟิล อีโอสิโนฟิล นิวโตรฟิล โมโนซัยท์ และ dendritic cell แม้ว่าเราจะทราบว่ากระบวนการที่สำคัญของการเจริญเติบโตของเซลล์ในระบบเลือดจะเกิดขึ้นภายในเซลล์ต้นกำเนิดและเซลล์ต้นแบบของเม็ดเลือด อย่างไรก็ตามยังคงมีคำถามหลงเหลืออยู่หลายประการ เกี่ยวกับขั้นตอนต่าง ๆ ของกระบวนการที่เกี่ยวข้อง ได้แก่กลไกในระดับอณูที่ควบคุมกระบวนการการแบ่งตัวของเซลล์ต้นกำเนิดและเซลล์ต้นแบบ กระบวนการการตัดสินใจของเซลล์เหล่านี้ว่าจะเจริญไปเป็นเม็ดเลือดชนิดใดและกระบวนการการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ต้นกำเนิดและเซลล์ต้นแบบไปเป็นเซลล์ที่จำเพาะเจาะจงชนิดต่าง ๆ ซึ่งกระบวนการเหล่านี้นับได้ว่าเป็นขั้นตอนที่เป็นหัวใจสำคัญของกระบวนการการเจริญเติบโตของระบบเลือด ปัจจัยที่สำคัญอย่างยิ่งยวดต่อกระบวนการเหล่านี้ได้แก่ transcription factor ชนิดต่าง ๆ ตัวอย่างของ transcription factors ที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดได้แก่ Scl/Tal1, Aml1/Runxl และ C-Myb สำหรับ transcription factor ที่จำเป็นต่อการตัดสินใจของเซลล์ต้นแบบว่าจะเจริญเป็นเซลล์เม็ดเลือดแดง ได้แก่ GATA-1 ส่วน

transcrption factor ที่จำเป็นต่อการตัดสินใจของเซลล์ต้นแบบว่าจะเจริญเป็นเซลล์เม็ดเลือดสาย myeloid และ lymphoid ได้แก่ PU.1 และtranscription factor ที่จำเป็นต่อการตัดสินใจของเซลล์ต้นแบบว่าจะเจริญไปเป็นสาย myeloid ได้แก่ C/EBPa ซึ่งกลไกการทำงานส่วนหนึ่งของ Transcription factor เหล่านี้ต่อการเจริญของระบบเลือด คือ 1) การควบคุมการแสดงออกของตัวรับบนผิวเซลล์ต่อสารกระตุ้นการเจริญเติบโตที่เซลล์ได้รับ 2) การควบคุมการแสดงออกและการทำงานของ transcription factor ชนิดอื่น ๆ 3) การควบคุมกระบวนการการแสดงออกของจีนที่จำเพาะต่อการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ต้นกำเนิดเป็นเซลล์ที่จำเพาะเจาะจง จากการศึกษาพบว่าการทำลายจีนของ transcription factor เหล่านี้จะส่งผลให้มีความผิดปกติของระบบการเจริญเติบโตของเม็ดเลือดและความผิดปกติในการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดเป็นเซลล์ที่จำเพาะเจาะจงในสายต่าง ๆ ของระบบเลือดอีกด้วย นอกจากนี้ยังพบว่าการกดการทำงานของ transcription factor จะส่งเสริมให้เซลล์มีการแบ่งตัวมากขึ้นและไม่สามารถเติบโตเป็นเซลล์ที่จำเพาะเจาะจงต่อไปได้ ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดมะเร็งเม็ดเลือดหลายชนิด

Id Transcription factor

โปรตีนกลุ่ม Inhibitor of DNA – binding (Id) เป็น Transcription factor ในกลุ่ม Helix – loop – helix (HLH) ซึ่งในปัจจุบันได้มีการค้นพบโปรตีน Id นี้ทั้งหมด 4 ชนิด ได้แก่ Id1-Id4 โดยที่โปรตีน Id1-Id3 มีการแสดงออกในเซลล์ของระบบเลือด และโปรตีน Id4 มีการแสดงออกในเซลล์ชนิดอื่น ๆ ที่มิใช่เซลล์เม็ดเลือด โปรตีน Id ไม่มีโครงสร้างที่เรียกว่า basic (b) DNA-binding domain เฉกเช่น โปรตีน HLH ตัวอื่น ๆ ซึ่งโครงสร้างดังกล่าวจะทำหน้าที่จับกับบริเวณที่จำเพาะบนสายดีเอ็นเอที่เรียกว่า E-box (CANNTG) หรือบริเวณที่มีลำดับเบสที่ใกล้เคียงได้แก่ N-box (CACNAG) ดังนั้นโปรตีน Id จึงไม่สามารถจับกับสายดีเอ็นเอได้โดยตรง อย่างไรก็ตามโปรตีนนี้สามารถควบคุมการแสดงออกของจีนเป้าหมายได้โดยการจับคู่กับ bHLH transcription factor ชนิดอื่นอีก 1 ชนิด อาทิเช่น E2A, HEB, MyoD และ SCL จากนั้นจะทำให้เกิดโครงสร้างที่ไม่สามารถทำงานได้ ซึ่งหากโปรตีน Id จับกับ bHLH transcription ไม่ว่าโปรตีนนี้จะอยู่ในรูป homodimer หรือ heterodimer จะทำให้โปรตีน bHLH ไม่สามารถจับกับสาย DNA ได้อีก และส่งผลให้การแสดงออกของจีนเป้าหมายหยุดชะงักซึ่งวิธีนี้ทำให้โปรตีน Id สามารถควบคุมการแสดงออกของจีนเป้าหมายได้ ดังนั้นโปรตีน Id จึงทำหน้าที่เป็นตัวควบคุมชนิดลบของการทำงานของโปรตีน bHLH

การแสดงออกของ Id transcription factors ในเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน เซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือด เซลล์ต้นแบบของเม็ดเลือดและเซลล์เม็ดเลือดที่ได้มีการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ที่จำเพาะเจาะจง

การเจริญเติบโตและกระบวนการการเปลี่ยนแปลงของเซลล์หลายชนิดถูกควบคุมโดยโปรตีนกลุ่ม Id transcription factor จากการทดลองทำการเปลี่ยนแปลงเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนเป็นเซลล์เม็ดเลือดชนิดต่าง ๆ ในหลอดทดลองพบว่า Id1, Id2, Id3, Id4 มีการแสดงออกน้อยมากในระดับจีนในเซลล์ที่อยู่ในระยะเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนและระยะ embryoid body ส่วนการเจริญเติบโตของเซลล์ในช่วง blast cell colonies นั้นพบว่า การแสดงออกของจีน Id1, Id2 และ Id4 ถูกควบคุมให้ลดระดับลงในขณะที่การแสดงออกของจีน Id2 ยังคงถูกรักษาไว้ให้อยู่ในระดับปกติ จากข้อมูลนี้จะเห็นได้ว่า Id1, Id3 และ Id4 ทำหน้าที่เป็นตัวควบคุมลบในช่วงเริ่มแรกของกระบวนการการเจริญเติบโตของระบบเลือดจากเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมาเป็นเซลล์ในระยะ blast cell ต่อมาได้มีการศึกษาแบบแผนการแสดงออกของโปรตีน Id โดยวิธี real-time PCR ในเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดและเซลล์ต้นแบบของเม็ดเลือดในระยะต่าง ๆ ซึ่งพบว่าจีน Id1 และ Id2 มีการแสดงออกในระดับที่น้อยมากหรือไม่มีการแสดงออกเลยในเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดที่ได้รับการแยกให้บริสุทธิ์ อย่างไรก็ตามการแสดงออกของจีน Id1 และ Id2 นี้จะเพิ่มมากขึ้นในเซลล์ต้นแบบระยะ

common myeloid progenitors และเพิ่มมากขึ้นต่อไปในเซลล์ต้นแบบระยะ granulocyte/macrophage progenitors ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าการแสดงออกของจีน Id1 และ Id2 จะเกิดขึ้นในระดับที่สูงขึ้นในระหว่างการเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิดไปเป็นเซลล์ต้นแบบในสาย myeloid ในทางตรงกันข้ามการแสดงออกของจีน Id1 มีระดับลดลงในเซลล์ต้นแบบสายเม็ดเลือดแดงและเกล็ดเลือดระยะ megakaryocyte/erythroid progenitors รวมถึงเซลล์เม็ดเลือดแดงที่เต็มวัย เมื่อเทียบกับเซลล์ต้นแบบระยะ common myeloid progenitors ซึ่งมีระดับการแสดงออกของจีนที่สูงกว่า แสดงให้เห็นว่าการแสดงออกของ Id1 มีระดับที่ลดลงและคงอยู่ในระดับต่ำ ในระหว่างการเจริญเติบโตของเซลล์ในสายเม็ดเลือดแดง ยิ่งไปกว่านี้ Id1 และ Id2 ยังมีการแสดงออกในระดับน้อยมากหรือไม่มีเลยในเซลล์ต้นแบบระยะ common lymphoid progenitors, เซลล์ที และ เซลล์บี แสดงให้เห็นว่าระดับของ Id1 จะถูกรักษาให้อยู่ในระดับที่ต่ำในระหว่างการเจริญเติบโตของเซลล์ในสาย lymphoid สำหรับการแสดงออกของ Id3 พบว่าไม่มีการแสดงออกในเซลล์ต้นกำเนิดของเม็ดเลือด ไม่พบการแสดงออกของ Id4 ในเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดและในระหว่างการเจริญเติบโตของเซลล์ในระบบเลือด จากการศึกษาอื่น ๆ พบว่ามีการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอของ Id1 ในเซลล์ต้นแบบที่ตัดสินใจแล้วว่าจะไปเป็นเซลล์ชนิดใดแต่ไม่พบในเซลล์ต้นแบบในระยะเริ่มต้น ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการแสดงออกของ Id1 มีความสัมพันธ์กับระยะของการเจริญเติบโตในขณะที่การแสดงออกของ Id2 มีความสัมพันธ์กับระยะที่เซลล์หยุดการเจริญเติบโต และ Id2 ส่งผลให้มีการผลักดันให้เซลล์เม็ดเลือดมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างต่อไป

ระดับการแสดงออกของโปรตีน Id ยังมีความแตกต่างกันในเซลล์เม็ดเลือดชนิดต่าง ๆ โปรตีน Id1 มีการแสดงออกในระดับต่ำในเซลล์ไขกระดูกและแกรนูลโลซัยท์ที่แยกให้บริสุทธิ์โดยใช้ Gr-1 cell surface marker ในขณะที่พบ Id1 ในระดับที่น้อยมากหรือไม่พบเลยในเซลล์เม็ดเลือดแดงที่แยกให้บริสุทธิ์โดยใช้ TER119 cell surface marker และ เซลล์บีที่แยกให้บริสุทธิ์โดยใช้ B220 cell surface marker ซึ่งเซลล์ทั้งสองกลุ่มนี้แยกมาจากเซลล์ในไขกระดูก อย่างไรก็ตามพบว่าการแสดงออกของ Id1 มีปริมาณมากขึ้นในกลุ่มเซลล์ต้นแบบของเซลล์เม็ดเลือดทุกสาย (lineage-low) ซึ่งเป็นเซลล์ที่พบในไขกระดูก เซลล์ต้นแบบนี้มีเพียงประมาณ 1% ของเซลล์ทั้งหมดในไขกระดูก โดยที่เซลล์ในไขกระดูกส่วนใหญ่เป็นเซลล์ต้นแบบของสาย myeloid สำหรับการแสดงออกของโปรตีน Id1 ในกลุ่มเซลล์ในสาย lymphoid ที่อาศัยอยู่ในม้าม พบว่ามีอยู่ในระดับที่น้อยมากรวมทั้งเซลล์บีที่แยกให้บริสุทธิ์โดยใช้ B220 cell surface marker และเซลล์ทีที่แยกให้บริสุทธิ์โดยใช้ CD3 cell surface marker จากผลการตรวจสอบทั้งหมดนี้ชี้ให้เห็นว่า Id1 จะมีการแสดงออกในระดับสูงในกลุ่มเซลล์ต้นแบบของเซลล์เม็ดเลือดทุกสายในกระดูกและจะลดระดับลงในแกรนูลโลซัยท์ที่แยกให้บริสุทธิ์ด้วย Gr-1 cell surface marker จนกระทั่งมีระดับที่ต่ำมากในเซลล์สายเม็ดเลือดแดงและเซลล์ในสาย lymphoid นอกจากนี้ Id1 ยังมีระดับที่ลดลงในระหว่างการเจริญเติบโตของเซลล์ต้นแบบในสาย myeloid ไปเป็นเซลล์ แกรนูลโลซัยท์เต็มวัย ในทางตรงกันข้ามระดับของ Id1 จะถูกรักษาไว้ในระดับสูงในระหว่างการเจริญเติบโตของเซลล์ต้นแบบในสาย myeloid เป็นเซลล์มาโครฟาจ แสดงให้เห็นว่าระดับที่สูงของ Id1 อาจจะเป็นสิ่งสำคัญที่ช่วยในการตัดสินใจของเซลล์และก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ต้นแบบของสาย myeloid เป็นเซลล์มาโครฟาจแทนที่จะเป็นเซลล์แกรนูลโลซัยท์

จีน Id1 ยังมีการแสดงออกในระดับที่แตกต่างกันในเซลล์ EML ซึ่งเซลล์ EML นี้มีความคล้ายคลึงกับเซลล์ต้นกำเนิดของเม็ดเลือดปกติ ส่วนเซลล์ MPRO มีความคล้ายคลึงกับเซลล์ต้นแบบของสาย myeloid ซึ่งมีระยะการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ไปแล้วประมาณ 40 ชั่วโมงจากเซลล์ระยะต้นกำเนิดเม็ดเลือด จากการศึกษาการแสดงออกของ Id1 ในเซลล์ทั้งสองชนิดนี้พบว่า 1) ใน เซลล์ EML มีการแสดงออกของ Id1 ในระดับที่ต่ำแต่ Id1 มีการแสดงออกในระดับสูงในเซลล์ MPRO 2) ในระหว่างการเจริญเติบโตของเซลล์ EML เป็นเซลล์ในสาย myeloid นั้น การแสดงออกของ

Id1 ในเซลล์ EML สามารถถูกกระตุ้นให้มีระดับสูงขึ้นได้โดย IL-3 และ 3) การแสดงออกของ Id1 ไม่สามารถถูกกระตุ้นให้มีระดับที่สูงขึ้นได้โดย cytokines ที่กระตุ้นการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ EML เป็นเซลล์ในสายเม็ดเลือดแดงหรือเซลล์บี ข้อมูลเหล่านี้แสดงให้เห็นว่าในช่วงแรกของการเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดเพื่อให้เจริญเปลี่ยนแปลงต่อไปเป็นเซลล์ในสาย myeloid จะมีการควบคุมการแสดงออกของ Id1 และ Id2 อย่างเคร่งครัด

Id1 เปรียบเสมือนตัวควบคุมที่อยู่ภายในเซลล์ที่คอยควบคุมชะตาของเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือด

ยังคงมีคำถามหลงเหลืออยู่ว่าจริงหรือไม่ที่การตัดสินใจของเซลล์ต้นกำเนิดว่าจะเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ใดในระหว่างการเจริญเติบโตของระบบเลือดนั้น เป็นผลมาจากการผลักดันโดยโปรแกรมที่อยู่ภายในเซลล์ หรือว่าเป็นผลมาจากสัญญาณที่มาจากภายนอกเซลล์ อาทิเช่น จริงหรือไม่ที่สารกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์เป็นสิ่งที่กำหนดชะตาของเซลล์ หรือสารกระตุ้นเหล่านี้เป็นเพียงปัจจัยเพื่อความอยู่รอดของเซลล์เท่านั้น คำตอบหนึ่งที่สามารถตอบคำถามเหล่านี้ได้ คือ ผลจากการศึกษาการควบคุมชะตาของเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือด โดย Id1 ซึ่งได้รับการศึกษาทั้งในหลอดทดลองและในสิ่งมีชีวิต การควบคุมให้มีการแสดงออกของ Id1 ในระดับที่มากกว่าปกติในเซลล์ EML พบว่า สามารถป้องกันไม่ให้เซลล์ต้นกำเนิดมีแนวโน้มที่จะเปลี่ยนเป็นเซลล์ในสายเม็ดเลือดแดงได้ แต่ในทางตรงกันข้ามกลับพบว่าสามารถส่งเสริมให้เซลล์ต้นกำเนิดมีแนวโน้มไปอีกทางหนึ่งโดยเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ในสาย myeloid ได้ในหลอดทดลอง ดังนั้นจะเห็นได้ว่าการควบคุมระดับของโปรตีน Id1 ในเซลล์ต้นกำเนิดสามารถกำหนดทิศทางชะตาชีวิตของเซลล์ให้เซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ต้นแบบของสาย myeloid ระยะ common myeloid progenitors และระยะ granulocyte/monocyte progenitors ตามลำดับ แทนที่จะมีทิศทางชะตาชีวิตไปในทางเซลล์ต้นแบบของสายเม็ดเลือดแดงระยะ megakaryocyte/erythroid progenitors นอกจากนี้ได้มีการศึกษาผลของ Id1 ต่อการสร้างระบบเม็ดเลือดขึ้นมาใหม่ในระยะยาวในสิ่งมีชีวิตโดยใช้เซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดเป็นโมเดลในการศึกษา ซึ่งการศึกษานี้กระทำโดยการแยกกลุ่มเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดให้บริสุทธิ์ จากนั้นนำไวรัสชนิด retrovirus ซึ่งได้รับการตัดต่อจีนของ Id1 เข้าไปแล้วนั้นมาใส่เข้าไปในเซลล์ที่แยกให้บริสุทธิ์นี้ หลังจากนั้นตามด้วยการนำเซลล์ที่ได้ไปปลูกถ่ายให้กับหนูที่ถูกฉายรังสีในระดับที่สามารถทำให้ตายได้หากไม่ได้รับการสร้างระบบเลือดใหม่ขึ้นมาทดแทน หลังจากการปลูกถ่ายเซลล์ได้ 4-6 เดือน ผลปรากฏว่ามีการสร้างระบบเลือดขึ้นมาใหม่และเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดของสัตว์ทดลองที่มีการแสดงออกของ Id1 ที่มากกว่าในระดับปกติที่ได้รับการปลูกถ่ายให้นี้สามารถถูกกระตุ้นให้เซลล์เจริญเติบโตไปเป็นเซลล์ในสาย myeloid ได้ดี ในทางตรงกันข้ามหนูที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์กลับมีความผิดปกติในการเจริญเติบโตของเซลล์ในสายเม็ดเลือดแดงและเซลล์บี ผลการทดลองนี้ได้รับการสนับสนุนจากผลการทดลองของกลุ่มอื่น ๆ ซึ่งได้ทำการศึกษาใน Transgenic mice โดยมีการควบคุมการแสดงออกของ Id1 ในระดับที่มากกว่าปกติเช่นกัน และพบว่าระดับของ Id1 ที่มากกว่าปกตินี้ทำให้การเจริญเติบโตของเซลล์ในสาย B-cell มีความผิดปกติในระยะตัวอ่อน pro-B-cell ยิ่งไปกว่านั้นการควบคุมให้มีการแสดงออกของ Id1 ในระดับที่มากกว่าปกติในเซลล์ megakaryocyte/erythroid progenitors ซึ่งเป็นเซลล์ต้นแบบในสายเม็ดเลือดแดงนั้นสามารถป้องกันไม่ให้เซลล์นี้เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเม็ดเลือดแดงได้ หากจะเปรียบเทียบผลของ Id1 ต่อการเจริญเติบโตของเซลล์เม็ดเลือดในสาย myeloid แล้ว จะพบว่าในขณะที่การแสดงของ Id1 ในระดับสูงไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตในระยะแรกของการเจริญเติบโตของเซลล์ในสาย myeloid แต่กลับพบว่าสามารถป้องกันไม่ให้เซลล์เจริญไปเป็นเซลล์แกรนูลโลซัยท์ที่เต็มวัยโดยไม่ส่งผลต่อการเจริญของเซลล์ไปเป็นเซลล์เต็มวัย มาโครฟาจ ดังนั้นจะเห็นได้ว่านอกจาก Id1 จะส่งผลต่อทิศทางชะตาของเซลล์ต้นกำเนิดว่าจะเปลี่ยนไปเป็นเซลล์ในสายใดระหว่างสาย myeloid หรือสายเซลล์เม็ดเลือดแดง หรือสาย lymphoid แล้ว Id1 ยังมีบทบาท

ร่วมในการควบคุมทิศทางชะตาของการเจริญเติบโตของเซลล์ในขั้นสุดท้ายระหว่าง เซลล์ มาโครฟาจ และเซลล์แกรนูลโลซัยท์อีกด้วย

จากข้อมูลทั้งหมดนี้จะเห็นได้ว่า การเพิ่มระดับการแสดงออกของ Id1 สามารถส่งเสริมให้

1) เซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดตัดสินใจเจริญไปเป็นเซลล์ในสาย myeloid แทนที่จะเจริญไปเป็นเซลล์ในสาย lymphoid

2) เซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดตัดสินใจเจริญไปเป็นเซลล์ในสาย myeloid แทนที่จะเจริญไปเป็นเซลล์ในสายเม็ดเลือดแดง

3) ควบคุมการตัดสินใจของเซลล์ต้นแบบในสาย myeloid ให้ตัดสินใจเจริญต่อไปเป็นเซลล์ มาโครฟาจ แทนที่จะไปเป็นเซลล์แกรนูลโลซัยท์