

На правах рукописи

**ЛЯНГУЗОВА
Мария Сергеевна**

**РОЛЬ МАРК- И R13K-ЗАВИСИМЫХ СИГНАЛЬНЫХ
КАСКАДОВ
В РЕГУЛЯЦИИ ПРОЛИФЕРАЦИИ
ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК МЫШИ**

03.00.25

гистология, цитология, клеточная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург
2007

**Работа выполнена в Институте цитологии РАН,
Санкт-Петербург**

Научный руководитель: доктор биологических наук
профессор **Поспелов Валерий Анатольевич**
Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург

Официальные оппоненты: доктор биологических наук
Корнилова Елена Сергеевна
Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург

доктор биологических наук
Паткин Евгений Львович
ГУ НИИ экспериментальной медицины РАМН

Ведущая организация: Санкт-Петербургский
государственный университет; биолого-почвенный факультет

Защита состоится "25" мая 2007 года в 13 час на заседании
Диссертационного совета Д.002.230.01 при Институте цитологии
РАН по адресу: 194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., д. 4.
www.cytspb.rssi.ru
email: cellbio@mail.cytspb.rssi.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института
цитологии РАН

Автореферат разослан " " апреля 2007 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Каминская Е.В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Одно из уникальных свойств эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) мышцы - способность к автономной пролиферации. В отличие от соматических клеток организма млекопитающего, например, фибробластов, ЭСК могут пролиферировать в отсутствие внешних митогенных сигналов (Schrott et al., 2001). Это свойство делает их схожими со злокачественно трансформированными клетками. Однако дерегуляция пролиферации опухолевых клеток вызвана мутациями в протоонкогенах и опухолевых супрессорах, в то время как ЭСК являются нормальными клетками, не несущими мутаций, в которых контроль за целостностью генома осуществляется очень строго, так как они происходят из клеток внутренней клеточной массы бластоцисты, дающей начало всем клеткам зародыша и впоследствии взрослому организму. Очевидно, неспособность ЭСК останавливаться в клеточном цикле обусловлена функционированием в них особой программы пролиферации.

Скорее всего, автономность деления ЭСК от внешних сигналов тесно связана с тем, что эти клетки пролиферируют очень быстро, так же как и их аналог *in vivo* - клетки внутренней клеточной массы бластоцисты. При развитии зародыша мышцы в период с 4.5 по 7.0 dpc (days post coitum) размер внутренней клеточной массы бластоцисты увеличивается от 20-25 клеток до примерно 4000 клеток. Таким образом, в бластоцисте на доимплантационной стадии происходит вспышка пролиферативной активности, молекулярные основы которой во многом ещё не ясны. Детальное изучение регуляции пролиферации ЭСК способствует пониманию событий раннего эмбрионального развития млекопитающих.

Преыдушие исследования молекул-регуляторов пролиферации в ЭСК мышцы показали, что в этих клетках белок Rb гиперфосфорилирован, а транскрипционный фактор E2F1 и комплексы cdk2/циклин E, cdk2/циклин A активны постоянно, независимо от стадии клеточного цикла (Stead et al., 2002; Savatier et al., 1994). В клетках других типов, например, в фибробластах, эти регуляторы клеточного цикла активируются только перед началом фазы синтеза ДНК в результате митогенной стимуляции клеток ростовыми факторами на ранней стадии фазы G1. В ЭСК

мышь фаза G1 очень коротка, и период чувствительности к митогенным сигналам из вне в ней, по-видимому, редуцирован. Вероятно, пролиферацию ЭСК мышь стимулирует независимая от внешних сигналов митогенная активность, которая постоянно поддерживает циклин-зависимые киназы и транскрипционный фактор E2F1 в активном состоянии. Какие сигнальные молекулы и каскады обеспечивают эту активность пока еще неизвестно. На клетках других типов показано, что митогенный сигнал от ростовых факторов к регуляторам клеточного цикла передают MAP-Erk киназный каскад и Р1ЗК-зависимый каскад (Jones, Kazlauskas, 2001). В связи с этим данные сигнальные пути представляются вероятными кандидатами на роль источников внутренней митогенной активности в ЭСК мышь.

Цели и задачи исследования

Целью настоящей работы было изучение вклада активностей MAPK и Р1ЗК-зависимых каскадов в регуляцию перехода G1/S в митотическом цикле эмбриональных стволовых клеток мышь.

В соответствии с этим были сформулированы следующие задачи:

- 1) выяснить, зависит ли активность Erk- и Р1ЗК-зависимых каскадов в эмбриональных стволовых клеток мышь от сыворотки;
- 2) с помощью фармакологических ингибиторов выяснить в какой степени активность MAPK и Р1ЗК-зависимых каскадов является необходимой для пролиферации эмбриональных стволовых клеток мышь;
- 3) исследовать, как удаление ростовых факторов и ингибирование Р1З-киназы влияет на активность регуляторов клеточного цикла в эмбриональных стволовых клетках мышь;
- 4) изучить выживаемость и рост популяции эмбриональных стволовых клеток мышь при сывороточном голодании и ингибировании активности Р1ЗК-зависимого сигнального пути.

Основные положения, выносимые на защиту

Эмбриональные стволовые клетки мышь способны пролиферировать при пониженной активности митоген-активируемых сигнальных каскадов, которая достигается сывороточным голоданием или обработкой клеток

фармакологическими ингибиторами киназ. В отсутствие ростовых факторов позитивные регуляторы пролиферации - киназа cdk2 и транскрипционный фактор E2F1 - в эмбриональных стволовых клетках мыши остаются активны.

Фармакологический ингибитор PI3K LY294002 вызывает накопление эмбриональных стволовых клеток мыши в фазе G1 клеточного цикла, которое сопровождается p27^{kip}-независимым снижением уровня активности киназы cdk2 и транскрипционного фактора E2F1. Присутствие ростовых факторов ослабляет эффект LY294002 на распределение ЭСК мыши по фазам клеточного цикла.

Научная новизна работы

Впервые было показано, что фармакологические ингибиторы MAPK каскадов (Erk, JNK, p38) не препятствуют пролиферации ЭСК мыши.

Впервые было показано, что сывороточное голодание не вызывает снижения активности циклин/киназных комплексов в ЭСК мыши.

Впервые было показано, что в ЭСК мыши обработка ингибитором PI3K LY294002 приводит к существенному снижению активности комплексов циклин E/cdk2 и транскрипционного фактора E2F1 по p27^{kip}-независимому механизму.

Впервые для ЭСК мыши описана зависимость антипролиферативного эффекта ингибиторов киназ PI3K (LY294002) и cdk2 (росковитина) от присутствия сыворотки в среде культивирования.

Теоретическое и практическое значение работы

Полученные в настоящем исследовании данные вносят вклад в понимание механизмов пролиферации эмбриональных стволовых клеток мыши. Выяснено, что регуляция перехода G1/S в ЭСК мыши осуществляется как автономными сигналами, независимыми от сыворотки, так и ростовыми факторами сыворотки. Полученная в данной работе сублиния ЭСК мыши, несущая ген люциферазы под E2F1-чувствительным промотором может быть использована в дальнейших исследованиях пролиферации ЭСК мыши.

Материалы диссертации могут быть использованы в

качестве иллюстративных материалов в учебных лекционных курсах по клеточной биологии.

Апробация работы

По теме диссертации опубликовано 3 статьи и сделано 4 сообщения на международных конференциях. Основные положения диссертации были доложены и обсуждались на научных семинарах Института цитологии РАН.

Финансовая поддержка работы

Работа выполнена при содействии Российского Фонда Фундаментальных исследований (проекты 03-04-49377 и 06-04-49058); программы Президиума РАН “Молекулярная и клеточная биология”; гранта NATO 979190.

Объём и структура диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов, обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Материалы диссертации изложены на 120 страницах машинописного текста и иллюстрированы 34 рисунками.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Клеточные линии, их культивирование и обработка. В работе использовались ЭСК мыши линий IOUD2 и E 14.1. Линия IOUD2 была любезно предоставлена П.Саватьером (Лион, Франция), линия E 14.1 - А.Нордхаймом (Тюбинген, Германия). Клетки культивировали в среде DMEM (Gibco BRL, США) с добавлением 10 % FCS (ПАА, Австрия) и фактора LIF (Sigma, США) в концентрации 25 ед/мл на пластиковых чашках Петри (Corning, США), покрытых 0.2 %-ным раствором желатина. Сывороточное голодание проводили, культивируя клетки в среде, содержащей 0.1 % FCS без фактора LIF. Использовали ингибиторы киназ: PD98059 (50 мкМ), SB203580 (20 мкМ), SP600125 (10мкМ), росковитин (10мкМ), LY294002 (40 мкМ) (Calbiochem, Германия).

Для индукции дифференцировки клетки рассеивали в среде, не содержащей LIF, на следующий день добавляли 1 мкМ ретиноевой кислоты (All-trans retinoic acid, Sigma, США), и культивировали 2 сут. После этого клетки культивировали еще 1

сут в чистой (без ретиноевой кислоты) среде.

Подсчет клеток. Клетки высевали в количестве 50 тыс. трехсантиметровые чашки; каждую точку - в трёх повторностях. На следующий день условия культивирования меняли в соответствии с экспериментом. Через сутки проводили подсчет клеток в камере Горьева.

Оценка жизнеспособности популяций (МТТ-тест). Оценку жизнеспособности популяции производили колориметрическим методом с использованием метилтиазолилдифенилтетразолиума бромид (МТТ) (Sigma, США). Метод основан на том, что митохондриальные оксидоредуктазы (преимущественно дегидрогеназы) способны восстанавливать желтый МТТ до пурпурного формазана, количество которого затем измеряют спектрофотометрически. Поскольку эта реакция происходит только в живых клетках с активными митохондриальными ферментами, количество формазана коррелирует с числом живых клеток в популяции. В наших опытах клетки рассеивали на 96-луночную плату, на следующий день меняли среду и добавляли LY294002 на 1 сут. После этого среду удаляли, к клеткам добавляли 0.5 мг/мл МТТ, растворенного в PBS, и инкубировали в течение 1 ч при 37°C в атмосфере 7.5 % CO₂. Образовавшийся осадок формазана растворяли, добавляя в лунку равный объем 0.04 М HCl в изопропанол и тщательно пипетируя. Затем измеряли оптическую плотность образцов при длине волны 570 нм относительно чистого раствора МТТ с добавленным в него 0.04 М HCl в изопропанол.

Проточная цитофлуориметрия ДНК. Растущую в монослое культуру клеток снимали с чашек раствором Версена, центрифугировали 5 мин при 1000 g, ресуспендировали в буфере, содержащем 0.25М сахарозы и 40 mM цитрата натрия. После этого к пробам добавляли лизирующий буфер (0.5 % NP-40, 0.5 mM ЭДТА, PBS), содержащий 200 мкг/мл РНКазы и 20 мкг/мл иодистого пропидия, и инкубировали 10 минут. Пробы подвергали анализу на содержание ДНК на проточном цитометре (Beckman Coulter, США).

Электрофорез и иммуноблоттинг. Клетки промывали фосфатно-солевым буфером (PBS), затем лизировали в буфере PBS, содержащем 1 % NP-40, 0.5 % дезоксихолата натрия, 0.1 % SDS, ингибиторы протеаз и фосфатаз с последующим центрифугированием. Количество белка в пробах измеряли по

методу Брэдфорд, на форец наносили равное количество белка в каждой пробе. После диск-электрофореза в ПААГ в денатурирующих условиях проводили полусухой электроперенос белков на нитроцеллюлозную или PVDF мембрану (Amersham, Великобритания). Для окрашивания антителами мембрану инкубировали сначала в буфере PBS, содержащем 0.05 % Tween-20, 5 % обезжиренного молока, а затем в PBS, содержащем 0.05 % Tween-20, 1 % BSA, и соответствующие первые антитела. В качестве первых антител использовали антитела к фосфорилированному по Ser-473 белку PKB/Akt (кат. № 9271), к расщепленной форме каспазы 3 (кат. № 9661) (Cell Signaling, США), к фосфорилированной (sc-7383) и тотальной (sc-94) форме киназы Erk, циклину D1 (sc-717), циклину A (sc-751) и циклину E (sc-418), к cdk2 (sc-163), к ингибитору циклин-киназных комплексов p27^{kip} (sc-1641) (Santa Cruz Biotechnologies, США), белку GAPDH (5G4, NuTest, Финляндия). В качестве вторых антител использовали антитела козла против иммуноглобулинов кролика или антитела кролика против иммуноглобулинов мыши, конъюгированные с пероксидазой хрена. Белки выявляли методом усиленной хемилюминисценции (ECL, Amersham, Великобритания).

Люциферазная активность. Для изучения динамики транскрипционной активности факторов E2F1 клетки линии IUOD2 были котрансфицированы плазмидами E2F1-luc, несущей ген люциферазы под E2F1-чувствительным промотором, и pVabe-riго, кодирующей ген устойчивости к пуромицину. Трансфекцию проводили с помощью реагента Липофектамин-2000 в соответствии с рекомендациями производителя (Gibco, BRL). Полученные в результате селекции в присутствии пуромицина клоны были собраны в популяцию и использовались для анализа. Трансактивацию E2F1-luc оценивали по степени расщепления субстрата люциферина с помощью люцинометра TD-20/20 Turner Design. Результаты нормированы по количеству белка.

In vitro анализ активности киназ проводили, используя в качестве субстрата для фосфорилирования гистон H1. Клеточные лизаты получали, инкубируя клетки 45 мин на льду в лизирующем буфере (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.5 % NP-40, 1 % Тритона X-100, ингибиторы протеаз и фосфатаз) с последующим центрифугированием. Для иммунопреципитации инкубировали 500 - 1000 мкг белка с 5 мкл антител к циклину E (sc-418) или cdk2

(sc-163) (Santa Cruz) в течение 2-4 ч при 4°C, затем полученные комплексы осаждали, инкубируя с протеин А-сефарозой 30-60 мин при 4°C с последующим центрифугированием. Осадок использовали в киназной реакции, проводимой в буфере содержащем 20 мМ HEPES pH 7.9, 20 мМ MgCl₂, 2 мМ MnCl₂, 1 мМ дитиотреитола, 25 мкМ немеченого АТФ, 74 кБк [³²P]АТФ и 1 мкг гистона H1. Реакцию проводили 20 мин при 30°C и останавливали добавлением буфера Лэмли для нанесения проб. Пробы кипятили 5 мин, после электрофореза гель сушили и экспонировали перед рентгеновской пленкой.

Оценка ассоциированной со старением активности бета-галактозидазы. Клетки промывали буфером PBS, фиксировали при комнатной температуре в PBS, содержащем 0.5 % глутаральдегида и 2 % формальдегида в течение 5 мин, затем промывали PBS, pH = 7.2, содержащем 1.0 мМ MgCl₂, и инкубировали в окрашивающем растворе на 37°C в течение ночи. Окрашивающий раствор включает в себя 1 мг/мл X-gal, 0.12 мМ K₃Fe(CN)₆, 0.12 мМ K₄Fe(CN)₆, 1.0 мМ MgCl₂, растворенных в PBS pH = 6.0.

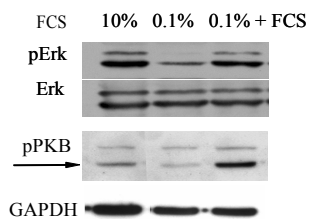
РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Анализ распределения ЭСК мышцы по фазам клеточного цикла в условиях инактивации сигнальных каскадов, зависящих от MAP-киназ и PI3-киназы.

ЭСК мышцы пролиферируют с высокой скоростью (время удвоения популяции составляет 10 - 12 часов), очень быстро проходят фазу G1 и, в отличие от фибробластов, не выходят из клеточного цикла в фазу покоя G0 при удалении ростовых факторов из среды культивирования (Schratt et al., 2001). Молекулярные механизмы, обуславливающие автономность пролиферации ЭСК мышцы от ростовых факторов, пока ещё мало изучены. Вероятно, этих клетках сигнальные каскады, необходимые для перехода G1/S, не нуждаются в стимуляции экзогенными факторами, в результате чего ЭСК постоянно коммитированы к пролиферации.

Из исследований на фибробластах известно, что для инициации продвижения по фазе G1 и перехода в фазу синтеза ДНК клетке необходима последовательная активация ростовыми факторами сигнальных каскадов, опосредованных киназами Erk и PI3K (Jones et al., 1999; Jones, Kazlauskas, 2001). В связи с этим

Рис. 1. Влияние сыворотки на уровень фосфорилирования киназ Erk и PKB/Akt в ЭСК мыши. 10 % FCS - нормальные условия культивирования, 0.1 % FCS – сывороточное голодание в течение суток, 0.1 % +FCS – стимуляция 15 % сыворотки в течение 15 мин после сывороточного голодания.



интересно было выяснить, чувствительны ли данные каскады к содержанию сыворотки в среде культивирования в ЭСК мыши.

Проведенный Вестерн-блот анализ содержания фосфорилированных (то есть, активных) форм киназ Erk и PKB/Akt (которые являются ключевыми звеньями Erk- и PI3K-зависимых каскадов соответственно) показал, что при низком содержании сыворотки (0.1 %) количество фосфорилированных киназ Erk и PKB/Akt снижается, а последующая сывороточная стимуляция значительно активирует как Erk-, так и PI3K-зависимые каскады в ЭСК мыши. Следует отметить, что при сывороточном голодании фосфорилированные формы киназ не исчезают полностью (рис.1).

Для того чтобы выяснить участие PI3K-зависимого и MAP-киназных каскадов в регуляции пролиферации ЭСК, клетки культивировали в течение суток с ингибиторами ключевых киназ этих каскадов, а затем методом проточной цитофлуориметрии проводили анализ клеточного цикла. Были использованы ингибиторы киназ PI3K (LY294002), MEK1/Erk (PD98059), p38 (SB203580) и JNK (SP600125). На рисунке 2 видно, что, в то время как ингибиторы MAP-киназ и сывороточное голодание не влияли на распределение ЭСК по фазам клеточного цикла, ингибитор PI3-

	G1	S	G2	G1/S соотношение
Контроль	21%	69 %	10%	0.3
PD98059	21 %	65 %	14 %	0.3
SB203580	20 %	68 %	12 %	0.3
SP600125	19 %	62 %	19 %	0.3
LY294002	32 %	54 %	14 %	0.6
Голодание	19 %	67 %	14 %	0.3

Рис. 2. Распределение ЭСК по фазам клеточного цикла после 24 ч инкубации с ингибиторами MAP киназ MEK1/Erk (PD98059), p38 (SB203580), JNK (SP600125), PI3K (LY294002) и сывороточного голодания.

киназы LY294002 вызвал заметное снижение содержания клеток в фазе S и накопление в фазе G1, увеличивая соотношение фаз G1/S с 0.3 до 0.6.

В митотическом цикле ЭСК мыши фаза G1 значительно короче, чем у фибробластов. Вероятно, у них редуцирована первая часть фазы G1 и, соответственно, отсутствует зависимость пролиферации от ростовых факторов сыворотки и активности MEK/Erk каскада. Необходимость же активности PI3K-зависимого каскада для G1/S перехода в ЭСК, возможно, сохраняется. Это предположение подкрепляется данными о существовании ЭСК-специфичного конститутивно-активного белка Eras, который из всех возможных мишеней активирует преимущественно именно PI3K и положительно регулирует скорость пролиферации; а также данными о том, что ЭСК, в которых активность PI3K-зависимого каскада усилена в результате делеции гена фосфатазы PTEN растут гораздо быстрее, чем ЭСК дикого типа (Takahashi et al., 2003; Sun et al., 1999).

2. Анализ распределения ЭСК мыши по фазам клеточного цикла при сочетании сывороточного голодания и инактивации PI3K-зависимого сигнального каскада.

Было обнаружено, что при обработке ЭСК мыши ингибитором PI3-киназы LY294002 в условиях сывороточного голодания антипролиферативный эффект ингибитора значительно усиливается: более половины популяции накапливается в фазе G1, содержание клеток в фазе S снижается до 27 % (рис. 3А).

Киназа PKB/Akt - ключевой участник PI3K-зависимого каскада, по уровню фосфорилирования PKB/Akt можно судить об активности данного сигнального пути. На рисунке 3Б видно, что как в нормальных условиях, так и при сывороточном голодании обработка ЭСК LY294002 приводит к значительной инактивации в них сигнального пути PI3K-PKB/Akt. То есть, наблюдаемое на рис. 3А различие антипролиферативного эффекта LY294002 в нормальных и бессывороточных условиях обусловлено не разницей в степени инактивации PI3-киназы, а скорее наличием или отсутствием дополнительных митогенных сигналов от компонентов сыворотки.

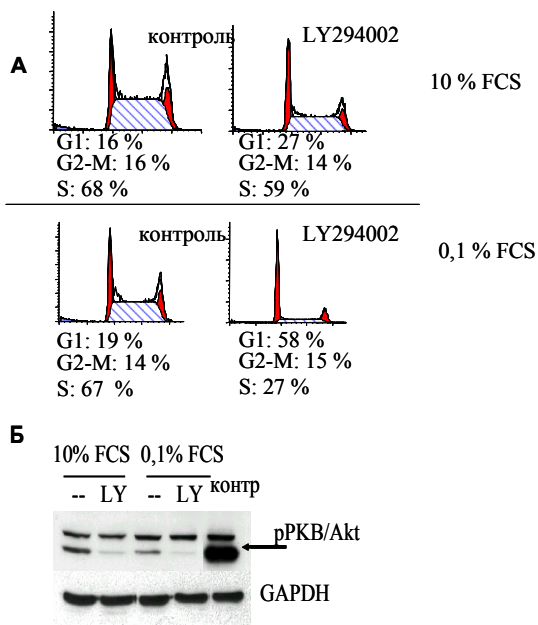


Рис. 3. Влияние присутствия сыворотки в среде культивирования на действие LY294002.

А - Распределение по фазам клеточного цикла ЭСК, обработанных LY294002 в нормальных условиях и при сывороточном голодании.

Б - уровень фосфорилирования киназы PKB/Akt в клетках, обработанных LY294002 в нормальных условиях и при сывороточном голодании.

3. Влияние сывороточного голодания и обработки LY294002 на содержание и активность белков, регулирующих G1/S переход в ЭСК мыши.

Для перехода из фазы G1 в фазу S клеткам необходима активность транскрипционного фактора E2F1. В начале фазы G1 факторы E2F1 находятся в комплексах с белками семейства Rb, оставаясь неактивными. Во время фазы G1 происходит множественное (гипер-) фосфорилирование белков Rb комплексами циклин D/cdk4,6, циклин E/cdk2. В результате факторы E2F1 высвобождаются, и становятся способны активировать транскрипцию генов, необходимых для синтеза ДНК. При сывороточном голодании в фибробластах циклин-киназные комплексы и фактор E2F1 остаются неактивными, вследствие этого клетки выходят из циклирования в фазу покоя G0.

В ЭСК мыши сывороточное голодание не снижает активности cdk2- и циклин E-содержащих комплексов, в то время как LY294002 приводит к существенному снижению их киназной активности (рис. 4А). Очевидно, что снижение активности происходит из-за уменьшения общего числа комплексов cdk2/

циклин Е в LY294002-обработанных клетках. На рисунке 4Б видно, что количество белков-компонентов этих комплексов - циклинов Е, А, и cdk2 после обработки LY294002 уменьшается. Кроме того, в результате обработки LY294002 снижается содержание циклина D1, но количество киназы cdk4 не изменяется (рис. 4Б). Известно, что в фибробластах антипролиферативный эффект ингибиторов PI3-киназы опосредован белком p27^{kip} - ингибитором циклин-киназных комплексов, количество которого возрастает при инактивации PI3К (Collado et al., 2000). В ЭСК, обработанных LY294002, падение активности циклин-киназных комплексов и остановка в фазе G1 не сопровождаются накоплением p27^{kip}, и происходят, по-видимому, по p27^{kip}-независимому механизму (рис. 4Б).

Известно, что в ЭСК белок Rb находится постоянно в гиперфосфорилированной форме, и фактор E2F1 активен

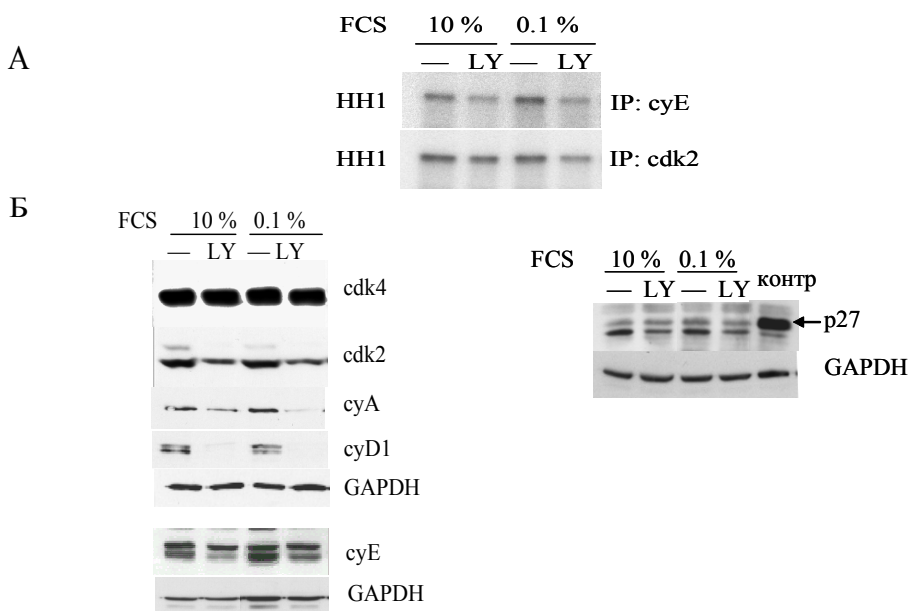


Рис. 4. Влияние LY294002 и сывороточного голодания на экспрессию и активность молекул, регулирующих переход G1/S. **А** – *in vitro* анализ активности киназ, ассоциированных с циклином Е и cdk2. **Б** – иммуноблотинг белков cdk4, cdk2, циклин А, циклин D1, циклин Е, p27, в качестве контроля нагрузки – GAPDH.

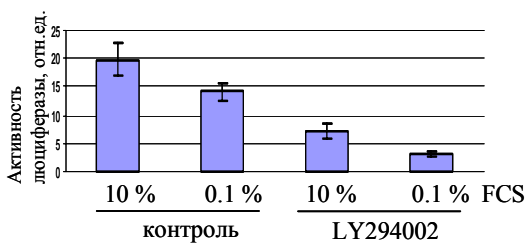


Рис. 5 Активность транскрипционного фактора E2F1 в клетках, обработанных LY294002 в нормальных условиях и при пониженном содержании сыворотки.

постоянно, независимо от фазы клеточного цикла (Savatier et al., 1994; Stead et al., 2002). Это, по-видимому, является основой автономности пролиферации ЭСК от внешних сигналов. Для анализа E2F1-зависимой транскрипции в клетках, культивированных в условиях сывороточного голодания или в присутствии LY294002, нами была создана сублиния ЭСК, трансфицированная репортерной плазмидой, кодирующей ген люциферазы под E2F1-регулируемым промотором. На рисунке 5 видно, что в результате обработки клеток LY294002 транскрипционная активность фактора E2F1 существенно снижается, особенно в условиях сывороточного голодания. Это согласуется с данными проточной цитометрии, свидетельствующими о максимальном подавлении пролиферации в случае сочетания обработки клеток LY294002 с сывороточным голоданием (рис. 3А) Сывороточное голодание само по себе также приводит к некоторому снижению активности E2F1, которое, вероятно, недостаточно для предотвращения перехода G1/S перехода, так как в бессывороточной среде ЭСК продолжают пролиферировать на высоком уровне (рис. 2, 3).

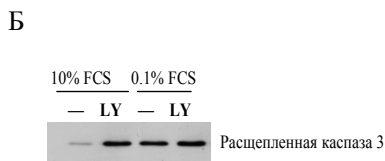
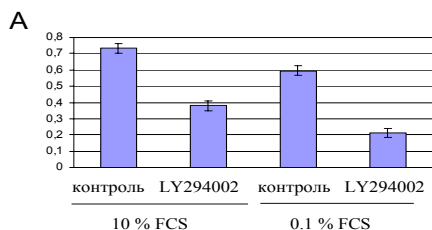


Рис. 6. Влияние LY294002 на рост популяции и гибель ЭСК. А – МТТ-тест, отражающий численность популяций ЭСК, культивируемых в условиях сывороточного голодания и в присутствии 40 мкМ LY294002. Б – иммуноблот на активную форму каспазы 3.

4. Анализ влияния ингибитора PI3K LY294002 на численность популяции ЭСК, выживание и старение клеток.

Роль PI3K-зависимого каскада как необходимого для выживания известна для клеток разных типов (Downward, 2004). Для оценки жизнеспособности ЭСК, обработанных ингибитором PI3-киназы, был применен МТТ-тест, выявляющий живые клетки по активности митохондриальных ферментов. Полученные данные представлены на рисунке 6А. Обработка ЭСК LY294002 сокращает число живых клеток более чем в два раза по сравнению с контрольной, необработанной ингибитором популяцией. Таким образом, жизнеспособность популяции ЭСК в результате обработки LY294002 снижается, причем негативный эффект проявляется как в нормальных, так и в бессывороточных условиях культивирования, но в присутствии сыворотки эффект ингибитора выражен слабее. Следует отметить, что сывороточное голодание само по себе приводит к сокращению численности популяции ЭСК (рис.6А).

Наблюдаемое сокращение численности популяции вызвано скорее всего двумя причинами: затруднением перехода G1/S (рис. 2 и 3А) и индукцией апоптотической гибели клеток (рис. 6Б). Об индукции апоптоза в ЭСК судили по накоплению в клетках расщеплённой (активной) формы каспазы 3.

Замедление и остановка пролиферации - один из признаков старения клеток (Campisi, 2001). В связи с этим мы проверили, не

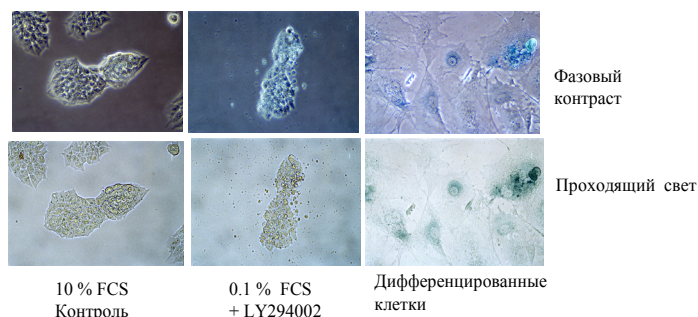
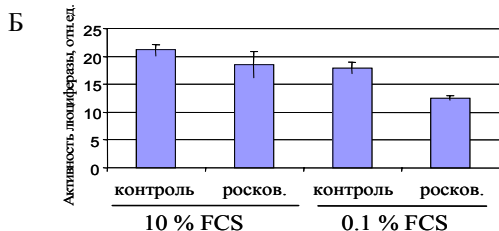


Рис. 7. Выявление ассоциированной со старением клеток активности бета-галактозидазы. Контроль – недифференцированные ЭСК, культивированные в нормальных условиях, 0.1 FCS+LY294002 – ЭСК, обработанные LY294002 в условиях сывороточного голодания. Дифференцированные в течение 1 месяца клетки использованы в качестве положительного контроля.

	G1	S	G2	G1/S соотн.
10%	18 %	70 %	12 %	0.3
10% +Rosc	26 %	64 %	10 %	0.4
0,1%	22 %	63 %	15 %	0.3
0,1% +Rosc	39 %	38 %	23 %	1.0
0,1% +Rosc+IGF1	35 %	45 %	18 %	0.8

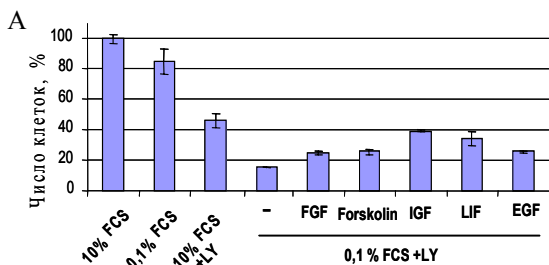
Рис. 8. Влияние росковитина на распределение ЭСК по фазам клеточного цикла (А) и активность транскрипционного фактора E2F1 (Б).



вызывает ли старения обработка клеток LY294002 в условиях сывороточного голодания. Был проведен анализ ассоциированной со старением активности бета-галактозидазы (senescence-associated beta-galactosidase activity, SA-beta-Gal). Результаты представлены на рисунке 7. Видно, что в ЭСК, обработанных LY294002 в условиях низкой сыворотки, демонстрирующих существенное накопление в фазе G1, цитоплазматической активности бета-галактозидазы не наблюдается. Кроме того, видно, что эти клетки выглядят апоптотирующими. В качестве положительного контроля для SA-beta-Gal были использованы ЭСК, дифференцированные с помощью ретиноевой кислоты в течение месяца.

5. Инактивация *cdk2* в условиях сывороточного голодания вызывает накопление ЭСК мыши в фазе G1

Поскольку в ЭСК, обработанных LY294002, накопление клеток в фазе G1 коррелирует со снижением количества и активности киназы *cdk2* (рис. 4), было проверено, является ли инактивация *cdk2* причиной остановки клеток в фазе G1. Для этого было проанализировано распределение по фазам клеточного цикла ЭСК, обработанных специфическим ингибитором киназ *cdk2* и *cdc2* росковитином (рис. 8А). Оказалось, что в присутствии сыворотки росковитин вызывает небольшие изменения в



Б

	G1	S	G2	G1/S соотношение
10%	19 %	70 %	11%	0.3
10% +LY	43 %	45 %	12 %	0.9
0.1%	21 %	72 %	7 %	0.3
0.1% +LY	51 %	35 %	14 %	1.4
0.1% +LY+LIF	49 %	35 %	16 %	1.4
0.1% +LY+IGF	50 %	34 %	16 %	1.5

Рис. 9. Влияние отдельных факторов на эффект LY294002.

А – численность популяций ЭСК, обработанных 20 мкМ LY294002 24 ч в присутствии различных факторов.

Б – распределение ЭСК по фазам клеточного цикла при обработке LY294002 в присутствии IGF и LIF.

распределении ЭСК по фазам цикла; однако в условиях сывороточного голодания он снижает содержание клеток в фазе S до 38 % по сравнению с 70 % в контроле, а содержание клеток в фазах G1 и G2 возрастает до 39 % и 23 % соответственно.

Изменения транскрипционной активности E2F1 при обработке росковитином соответствуют изменениям в распределении клеток по фазам клеточного цикла: значительное снижение активности наблюдается в клетках, обработанных росковитином в условиях сывороточного голодания (рис. 8Б). Вероятно, в ЭСК мыши переход G1/S регулируется как киназой cdk2, так и cdk2-независимыми механизмами, которые могут быть активированы ростовыми факторами сыворотки. Поэтому заметного снижения количества клеток в фазе S можно добиться только одновременным удалением сыворотки и инактивацией cdk2 с помощью росковитина.

Ростовой фактор IGF1, как известно, активирует PI3K-зависимый каскад. IGF-1 несколько сглаживает негативное влияние росковитина на G1/S переход ЭСК мыши, но всё-таки не так эффективно, как сыворотка (рис. 8А). Это позволяет предположить, что стимулирующее G1/S переход ЭСК мыши действие PI3K каскада опосредовано cdk2-содержащими комплексами.

6. Ростовые факторы ослабляют негативный эффект LY294002 на численность популяции ЭСК мышцы.

Поскольку при обработке ЭСК LY294002 наиболее сильное сокращение численности популяции (рис.6А) и снижение доли фазы S (рис. 3А) происходит в условиях сывороточного голодания, можно предположить, что сыворотка снабжает ЭСК митогенными или антиапоптотическими сигналами, устойчивыми к действию данного агента.

Чтобы выяснить, какие именно факторы сыворотки способствуют выживанию популяции ЭСК в присутствии LY294002, мы сравнили число клеток в контрольных популяциях (LY294002 в среде с 0.1 % FCS или с 10% FCS) и в популяциях, обработанных LY294002 в условиях сывороточного голодания с добавлением одного из следующих факторов: EGF, IGF-1, FGF, LIF, форсколин (рис. 9А). Число клеток было выше в том случае, когда вместе с LY294002 в среду добавляли ростовые факторы. Самый сильный “спасающий” эффект продемонстрировали факторы LIF и IGF-1. Тем не менее, присутствие 10 % сыворотки более эффективно спасало клетки от действия LY294002, чем отдельные ростовые факторы. Анализ клеточного цикла показал, что распределение клеток, обработанных LY294002 в присутствии и в отсутствии LIF и IGF-1 не отличаются (рис 9Б). Следовательно, данные факторы снабжают клетку скорее не митогенными стимулами, а сигналами к выживанию.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные данные приводят нас к заключению, что пролиферация ЭСК мышцы может быть стимулирована несколькими независимыми друг от друга сигнальными путями. Во-первых, ЭСК мышцы способны пролиферировать в отсутствие ростовых факторов в среде культивирования, что свидетельствует о существовании эндогенной митогенной активности. Наши исследования показали, что эту митогенную активность можно подавить ингибитором PI3K LY294002 или ингибитором cdk2 росковитином. Следует отметить, что подавление пролиферации LY294002 сопровождается снижением активности транскрипционных факторов E2F1 и cdk2-содержащих комплексов. Во-вторых, несмотря на способность ЭСК к пролиферации в отсутствие ростовых факторов, сыворотка, тем не менее, может

стимулировать пролиферацию ЭСК, о чем свидетельствует увеличение доли клеток в фазе S при добавлении сыворотки клеткам, обработанным LY294002 или росковитином.

Поскольку полученные данные свидетельствуют о том, что при сывороточном голодании в ЭСК мыши содержание и активность белков, положительно регулирующих пролиферацию (циклин D1, cdk2, E2F1), остаются на высоком уровне, а негативный регулятор пролиферации, p27^{kip}, наоборот, не накапливается, можно заключить, что в ЭСК не функционирует ставшая классической для клеток других типов цепь передачи сигнала “ростовые факторы - регуляторы клеточного цикла”. Интересно, что активность сигнальных каскадов Erk и PI3K в ЭСК мыши зависит от присутствия сыворотки в среде культивирования, а значит, упомянутая цепь разомкнута “ниже по течению” сигнала. На каком звене цепи возникает автономность митотического сигнала в ЭСК, и как происходит восстановление зависимости пролиферации от ростовых факторов в результате дифференцировки клеток - вопрос, который должен сать предметом исследований в ближайшее время.

Как отсутствие ростовых факторов, так и ингибитор PI3K LY294002 вызывают апоптоз ЭСК мыши. По-видимому, сыворотка снабжает ЭСК сигналами к выживанию, которые опосредованы в частности, PI3K-зависимым каскадом. Это предположение также требует более детального изучения.

ВЫВОДЫ

1. Удаление ростовых факторов из среды культивирования снижает активность Erk- и PI3K-зависимых каскадов в эмбриональных стволовых клетках мыши, но не вызывает остановки пролиферации; при этом в клетках не происходит снижения активности комплексов циклин E/cdk2.
2. Ингибирование активностей MAPK-каскадов (Erk, JNK, p38) не приводит к изменению распределения эмбриональных стволовых клеток мыши по фазам клеточного цикла, в то время как ингибитор PI3-киназы LY294002 вызывает накопление клеток в фазе G1 и снижение доли клеток в фазе синтеза ДНК. Антипролиферативный эффект ингибитора усиливается в условиях сывороточного голодания.
3. Ингибитор PI3-киназы LY294002 вызывает в

эмбриональных стволовых клетках мышцы снижение активности транскрипционного фактора E2F1, а также активности комплексов циклин E/cdk2, что, однако, не сопровождается накоплением ингибитора циклин-киназных комплексов p27^{kip}.

4. Как сывороточное голодание, так и обработка ингибитором PI3-киназы LY294002 вызывают апоптотическую гибель и негативно влияют на рост популяции эмбриональных стволовых клетках мышцы.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Лянгузова М.С., Чуйкин И.А., Поспелов В.А. 2004. Необходимость активации PI3-киназы для пролиферации клеток эмбриональной карциномы мышцы линии F9. Цитология. 46 (1):26-34.

2. Лянгузова М.С., Чуйкин И.А., Нордхайм А., Поспелов В.А. 2006. Фармакологические ингибиторы PI3-киназы вортманнин и LY294002 оказывают различное действие на пролиферацию эмбриональных стволовых клеток мышцы. Цитология. 48 (7):560-568.

3. Lianguzova M.S., Chuykin I.A., Nordheim A., Pospelov V.A. 2007. Phosphoinositide 3-Kinase inhibitor LY294002 but not serum withdrawal suppresses proliferation of murine embryonic stem cells. Cell Biol Int. 31:330-337.

4. Liangouzova M. S., Tchuikin I. A., Pospelov V. A. Proliferation of early embryonic cells depends on PI3 kinase activity but not MAP kinases activity. 14th European Student Conference at Charite (Берлин, Германия, 4-9 ноября 2003 г.). Abstract book. 405.

5. Поспелов В.А., Лянгузова М.С., Чуйкин И.А., Малашичева А.Б. Механизмы автономной пролиферации эмбриональных стволовых клеток мышцы. Международный симпозиум "Стволовые клетки, регенерация, клеточная терапия" (Санкт-Петербург, 25- 27 октября 2004 г.).

6. Лянгузова М.С., Чуйкин И.А., Поспелов В.А. Влияние ингибитора PI3 Киназы LY294002 на регуляцию перехода G1/S в эмбриональных стволовых клетках мышцы. VI Международная конференция "Молекулярная генетика соматических клеток" (Звенигород, Москва, 12-16 декабря 2005 г.). Сборник тезисов конференции, 98-99.

7. Lianguzova M.S., Nordheim A., Pospelov V.A. Influence of PI3-

kinase inhibitor LY294002 and serum deprivation on the proliferation of murine embryonic stem cells. FEBS/EMBO Workshop "Spatial and Temporal Regulation of Signaling" (Осло, Норвегия, 21-24 сентября 2006 г.).

СПИСОК ЦИТИРОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

Campisi J. 2001. From cells to organisms: can we learn about aging from cells in culture? *Exp Gerontol.* 36:607-618.

Collado M, Medema RH, Garcia-Cao I, Dubuisson ML, Barradas M, Glassford J, Rivas C, Burgering BM, Serrano M, Lam EW. 2000. Inhibition of the phosphoinositide 3-kinase pathway induces a senescence-like arrest mediated by p27Kip1. *J Biol Chem.* 275:21960-21968.

Downward J. 2004. PI 3-kinase, Akt and cell survival. *Seminars in Cell & Dev Biol.* 15:177-182.

Jones SM, Klinghoffer R, Prestwich GD, Toker A, Kazlauskas A. 1999. PDGF induces an early and a late wave of PI 3-kinase activity, and only the late wave is required for progression through G1. *Curr Biol.* 9:512-521.

Jones SM, Kazlauskas A. 2001. Growth factor-dependent signaling and cell cycle progression. *FEBS Lett.* 490:110-116.

Savatier P, Huang S, Szekely L, Wiman KG, Samarut J. 1994. Contrasting patterns of retinoblastoma protein expression in mouse embryonic stem cells and embryonic fibroblasts. *Oncogene.* 9:809-818.

Schratt G, Weinhold B, Lundberg AS, Schuck S, Berger J, Schwarz H, Weinberg RA, Ruther U, Nordheim A. 2001. Serum response factor is required for immediate-early gene activation yet is dispensable for proliferation of embryonic stem cells. *MolCell Biol.* 21:2933-2943.

Stead E, White J, Faast R, Conn S, Goldstone S, Rathjen J, Dhingra U, Rathjen P, Walker D, Dalton S. 2002. Pluripotent cell division cycles are driven by ectopic Cdk2, cyclin A/E and E2F activities. *Oncogene.* 21:8320-8333.

Sun H, Lesche R, Li DM, Liliental J, Zhang H, Gao J, Gavrilova N, Mueller B, Liu X, Wu H. 1999. PTEN modulates cell cycle progression and cell survival by regulating phosphatidylinositol 3,4,5,-trisphosphate and Akt/protein kinase B signaling pathway. *PNAS.* 96:6199-6204.

Takahashi K, Mitsui K, Yamanaka S. 2003. Role of ERas in promoting tumour-like properties in mouse embryonic stem cells. *Nature.* 423(6939):541-545.