



УДК 577.27; 612.017.1:616-006

АКТИВАЦИЯ СИГНАЛЬНЫХ МОЛЕКУЛ МАРК КАСКАДОВ В ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТКАХ КОСТНОГО МОЗГА ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ АЛЬФА-ФЕТОПРОТЕИНА *IN VITRO*

А.Ю. Богданов¹, Т.М. Богданова¹, Н.О. Кудрина¹, Н.А. Айтхожина²

¹РГП «Научный центр противинфекционных препаратов», г. Алматы, Казахстан

²РГП «Институт молекулярной биологии и биохимии им. М.А. Айтхожина», г. Алматы, Казахстан

В данной работе была изучена активация сигнальных молекул МАРК каскадов в ГСК костного мозга на примере CD34⁺CD133⁺, CD34⁺CD135⁺ и CD34⁺CD117⁺ ГСК в ходе их АФП-стимула *in vitro*. В результате было показано, что АФП специфически индуцирует фосфорилирование MEK1/2 и его мишени ERK1/2 во всех изученных субпопуляциях ГСК. В свою очередь мишени ERK1/2 были различными. Так, в цитоплазме CD34⁺CD133⁺ ГСК была выявлена активированная форма MNK1/2 и регуляторного фактора клеточного цикла Статмина. В нуклеоплазме CD34⁺CD133⁺ ГСК обнаруживалась активированная форма MSK1/2, транскрипционных факторов Stat3, Sap1/2, c-Jun и Egr-1, а также факторов биогенеза рибосом BRF1 и UBF. В цитоплазме CD34⁺CD135⁺ ГСК обнаружены активированные формы RSK1/2/3/4, MNK1/2 и Статмина. В ядре CD34⁺CD135⁺ ГСК выявлены фосфорилированные формы киназы RSK1/2/3/4, транскрипционных факторов Stat3, Elk-1, c-Fos, c-Jun, Egr-1 и факторов биогенеза рибосом BRF1 и UBF. В цитоплазме CD34⁺CD117⁺ ГСК показана фосфорилированная форма PLA₂ и Статмина. В ядре CD34⁺CD117⁺ ГСК найдены активированные формы транскрипционных факторов Stat3, Sap1/2, c-Fos, c-Jun и Egr-1, а также фактора биогенеза рибосом BRF1. Таким образом, в цитоплазме и нуклеоплазме трех различных типов ГСК костного мозга, при их индукции АФП в условиях *in vitro*, обнаруживаются как активные формы основных киназ, так и активные формы подчиненных киназ и регуляторных факторов ERK типа МАРК сигнальных путей. Это позволяет говорить о возможном функционировании данного типа МАРК каскадов в качестве ветви молекулярного механизма действия АФП в ГСК костного мозга.

Введение

Альфа-фетопротейн (АФП) - эмбриоспецифический сывороточный гликопротеин, который продуцируется клетками фетальной печени и желточного мешка и является главным компонентом ранней эмбриональной сыворотки млекопитающих [1-3]. В настоящее время многочисленными данными доказано, что АФП играет ключевую роль в пренатальном развитии плода в качестве ростового фактора [1, 2, 4-8]. Функциональная активность АФП была выявлена на всех стадиях пренатального развития: от оплодотворения до зиготы, в эмбриональном периоде и в развивающемся плоде [5, 8-12]. В последние десятилетия было продемонстрировано, что АФП является белком, регулирующим *in vitro* рост яйцеклеток, клеток плаценты, эпидермиса, эндотелия и матки, эмбриональных клеток, гепатоцитов, печеночных фагоцитов, кле-

ток яичника, яичка и молочной железы, а также клеток костного мозга [3, 9, 13-17]. Помимо этих эффектов, показана роль АФП в регуляции гемопоэза. Так, выявлена прямая корреляция активации гемопоэза и повышения уровня АФП у пациентов с гепатомой, причем поддержание высокого уровня продукции АФП напрямую коррелировало с наличием и активностью очагов гемопоэза в печени [18, 19]. В своих работах J. Bartha и др. показали прямую зависимость уровня материнского АФП с активностью гемопоэза у плода [17, 20, 21]. В дальнейшем было доказано, что АФП является регулятором начального звена гемопоэза – CD34⁺CD133⁺, CD34⁺CD135⁺ и CD34⁺CD133⁺ гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) костного мозга *in vitro* и *in vivo* [22-24]. В частности, доказано, что АФП оказывает влияние на ростовую и клоногенную активности, самосохранение, коммитирование, дифференциацию и про-



дукцию супрессорных факторов данных типов ГСК. При этом исследование молекулярных механизмов данного регуляторного действия АФП на ГСК выявило роль цАМФ-зависимых каскадов сигнала, а именно: цАМФ/РКА и цАМФ/Rap1 путей, во внутриклеточной передаче АФП-стимула *in vitro* и их активацию АФП в условиях *in vivo* [25-27]. Однако, данные пути являлись не единственными сигнальными каскадами, ответственными за генерацию ответной биологической активности ГСК на воздействие АФП [26]. В то же время одной из мишеней обоих цАМФ/РКА и цАМФ/Rap1 каскадов являлся регуляторный белок B-Raf [25], который в свою очередь является индуктором ERK типа MAPK сигнальных каскадов [28]. В связи с вышеизложенным, вопрос о существовании MAPK сигнальных путей в ходе реализации АФП-стимула в ГСК костного мозга остается открытым. Это имеет не только важное теоретическое значение с точки зрения расшифровки целостного механизма действия АФП в ГСК, но и прикладное значение для биотехнологии ГСК, так как MAPK каскады являются главными молекулярными механизмами в эмбриональных и ткане-специфических стволовых клетках, ответственными за генерацию их функций [29-32]. Понимание MAPK сигнальных путей в ГСК даст возможность их однонаправленной модуляции в сторону проявления строго определенных видов биологической активности, например, поддержания стволовости или направленной дифференциации. Поэтому в рамках данного исследования была изучена активация сигнальных молекул MAPK каскадов в ГСК костного мозга на примере CD34⁺CD133⁺, CD34⁺CD135⁺ и CD34⁺CD133⁺ ГСК в ходе их АФП-стимула *in vitro*.

Материалы и методы

Используемые животные

В качестве источника материала (костный мозг) в работе использовали самцов мышей линии СВА весом 20-22

грамма. Эвтаназию осуществляли цервикальной дислокацией после наркотизирования животных.

Получение суспензии клеток костного мозга

Костный мозг выделяли из бедренной и большой берцовой костей путем их промывания раствором для переноса клеток костного мозга (Sigma, США). Смыв собирали в стерильные 15 мл пластиковые контейнеры (BD Falcon, США) и ресуспендировали в данном объеме до получения гомогенной суспензии. Суспензию центрифугировали при 200 g в течение 10 мин при 4°C. Клеточный осадок ресуспендировали в среде Stemline II Methylcellulose Medium (Sigma, США). Клетки подсчитывали и оценивали содержание жизнеспособных клеток при помощи включения раствора трипанового синего (Sigma, США). Во всех экспериментах использовали суспензии с долей жизнеспособных клеток больше 90%.

Получение субпопуляций ГСК

Полученную суспензию клеток костного мозга наслаивали на ступенчатый градиент плотности перколла (Sigma, США) со следующими плотностями ступенек: $\rho_1=1,13$ г/мл, $\rho_2=1,10$ г/мл, $\rho_3=1,090$ г/мл, $\rho_4=1,076$ г/мл, $\rho_5=1,060$ г/мл и $\rho_6=1,033$ г/мл [33-35]. Клетки центрифугировали при 2500 g в течение 20 мин при 4°C. Клетки с плавучей плотностью $\rho=1,090$ г/мл [35] собирали и отмывали центрифугированием при 300 g в 20-кратном объеме культуральной среды DMEM (Sigma, США) в течение 15 мин при 4°C. Из полученной фракции клеток костного мозга иммуномагнитной сепарацией при помощи autoMACS Pro (Miltenyi Biotec, Германия) выделяли чистую популяцию CD34⁺ клеток путем позитивной селекции с использованием коммерческих наборов реагентов CD34 MultiSort Kit (Miltenyi Biotec, Германия), согласно инструкции производителя. Затем



из полученной популяции CD34⁺ клеток выделяли CD133⁺ клетки и CD117⁺ клетки при помощи соответствующих наборов реагентов CD133 MicroBead Kit и CD117 MicroBead Kit (Miltenyi Biotec, Германия), согласно инструкциям производителя. CD135⁺ клетки выделяли из пула CD34⁺ клеток при помощи биотинилированного антитела к CD135 маркеру (eBioscience, США) и набора реагентов Anti-Biotin MultiSort Kit (Miltenyi Biotec, Германия). Чистоту выделенных субпопуляций ГСК контролировали проточной цитометрией. Во всех экспериментах использовали клеточные культуры, состоящие на 90% и более из фенотипически однородных клеток.

Условия инкубирования клеток

Во всех экспериментах использовали культуральную среду Stemline II Methylcellulose Medium, содержащую 4 мМ L-глутамин, 100 мг/мл стрептомицина и 100 ед/мл пенициллина (Sigma, США). Инкубирование клеток осуществляли в CO₂-инкубаторе CO28IR Cell Culture Incubator (New Brunswick Scientific, Великобритания) при температуре 37°C, 5% CO₂ и 95% влажности.

Анализ активации сигнальных молекул

Суспензии ГСК ресуспендировали в среде Stemline II Methylcellulose Medium в концентрации 10⁷ клеток/мл. В культуральную среду добавляли раствор АФП в стерильном физиологическом растворе в конечной концентрации 50 мкг/мл. В экспериментах по изучению специфичности в качестве дополнительных индукторов использовали сывороточный альбумин (АЛБ), витамин D-связывающий белок (Вит D-СБ) и α-альбумин (α-АЛБ), конечная концентрация которых в среде составляла 50 мкг/мл. Также использовали поликлональное анти-АФП антитело (анти-АФП) в конечной концентрации 100

мкг/мл. Негативным контролем являлся раствор Хэнкса (Sigma, США). Клеточные суспензии инкубировали с АФП в течение 60, 120 и 240 мин. В случае изучения специфичности активации сигнальных молекул их инкубировали с АФП и другими индукторами в течение 240 мин.

Получение цитоплазматических и ядерных экстрактов

Цитоплазматические и ядерные экстракты субпопуляций ГСК извлекали при помощи набора реагентов NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents (Pierce, США), согласно инструкции производителя. При невозможности проведения анализа образцов после конечной очистки их лиофилизировали под вакуумом при помощи роторной лиофильной сушки Integrated SpeedVac Systems SPD2010 (Thermo Savant, Финляндия) и хранили при -86°C. Образцы разводили в 2 мл фосфатного буфера.

Иммунопреципитация

При проведении иммунопреципитации использовали недиализированные цитоплазматические экстракты субпопуляций ГСК. Полученные экстракты очищали путем их смешивания в соотношении 1:1 с неспецифическими мышинными антителами (Clontech, США) в титре 1:2000 и 100 мкл суспензии протеин А-Сепарозы (Amersham Biosciences, Швеция) [36]. Суспензию инкубировали 3 ч при 4°C, а затем центрифугировали при 500 g в течение 2 мин при 4°C. К полученному супернатанту добавляли соответствующие специфические антитела (конечный титр 1:1000) к неактивной форме изучаемого сигнального белка в соотношении 1:1 и 100 мкл суспензии протеин G-Сепарозы (Amersham Biosciences, Швеция) [36]. В экспериментах использовали следующие антитела: анти-SOS 1/2 антитело (Santa Cruz Biotechnology, США), анти-Rax-6 антитело (Abcam, США), анти-Sap1/2 антитело (Santa



Cruz Biotechnology, США), анти-ETS1/2 антитело (Santa Cruz Biotechnology, США), анти-TIF1 α антитело (ProSci Incorporated, США), анти-Erg1/2/3 антитело (Santa Cruz Biotechnology, США), анти-BRF1 антитело (Santa Cruz Biotechnology, США), анти-ETV1 антитело (Novus Biologicals, США), анти-Nur77 антитело (Cell Signaling Technology, США), анти-Myt1 антитело (Cell Signaling Technology, США), анти-MITF антитело (Abcam, США), анти-Mad1 антитело (Cell Signaling Technology, США), анти-RanPB3 антитело (Novus Biologicals, США) и анти-BUB1 антитело (Abcam, США). Суспензию инкубировали при постоянном встряхивании в течение 12 ч при 4°C и центрифугировали при 5000 g в течение 2 мин при 4°C. Супернатант удаляли, а осадок бидс отмывали 5 раз в 1 мл отмывочного буфера (0,5 mM Трис-HCl буфер с pH 8,0 (Sigma, США), содержащий 0,5 M NaCl (Sigma, США), 5,0 mM EDTA (Sigma, США), 0,02% NaN₃ (Sigma, США), 0,5% Тритона X-100 (Sigma, США), 0,5% DOC (Sigma, США) и 0,1% SDS (Sigma, США) [36]. После конечной отмывки к осадку бидс добавляли 50 мкл 2-кратного буфера для образцов (0,0625 M Трис-HCl буфер (pH 6,8), включающий 2% SDS, 20% глицерина (Sigma, США), 5% меркаптоэтанола (Sigma, США) и 0,01% бромфенолового синего (Sigma, США), смешивали и нагревали на водяной бане при 100°C в течение 5 мин. Иммунопреципитат переносили напрямую в SDS гель для анализа.

Вестерн блоттинг и иммуноблоттинг

SDS-электрофорез проводили согласно протоколу Laemmli U. [36]. Разделяющий гель являлся 4-20% градиентным гелем, который готовили наслаиванием 2-х растворов акриламида с различным процентным содержанием. Электрофорез белков проводили при помощи PROTEAN II Ready Gel System (Bio-Rad, США), согласно инструкции производителя. Концентрирование белков проводили при 80 В и 100 мА, а разделение белков - при 120 В и 200 мА. Гель переносили на 0,2 мкм

PVDF мембрану FluoroTrans W (Pall, США) с помощью аппарата для электропереноса белков PROTEAN II Trans-Blot Cell (Bio-Rad, США), согласно инструкции производителя. PVDF мембрану обрабатывали 1 ч 3% раствором бычьего сывороточного альбумина (Sigma, США) в фосфатно-солевом буферном растворе при 24°C. Мембрану отмывали фосфатно-солевым буферным раствором и инкубировали в течение 3 ч при 37°C с соответствующими антителами к активированной форме изучаемой сигнальной молекулы или со смесью анти-фосфотреонинового, анти-фосфотирозинового и анти-фосфосеринового (BD Transduction Laboratories) антител (титр 1:1000) в соотношении 1:1, в случае использования иммунопреципитированных сигнальных белков. В экспериментах использовали следующие антитела: анти-фосфо-MEK1/2(Ser217/221) антитело (Cell Signaling Technology, США), анти-фосфо-ERK1/2(Thr202/Tyr204) антитело (Cell Signaling Technology, США), анти-фосфо-MKK3/6(Ser189/207) антитело (Cell Signaling Technology, США), анти-фосфо-p38 MAPK(Thr180/Tyr182) антитело (Cell Signaling Technology, США), анти-фосфо-MKK4(Ser80) антитело (Cell Signaling Technology, США), анти-фосфо-MKK4(Ser271/Thr275) антитело (Cell Signaling Technology, США), анти-фосфо-SAPK/JNK(Thr183/Tyr185) антитело (Cell Signaling Technology, США), анти-фосфо-MEK5(Ser311/Thr315) антитело (Cell Signaling Technology, США), анти-фосфо-ERK5/BMK1(Thr218/Tyr220) антитело (Cell Signaling Technology, США), анти-фосфо-p90RSK (Thr359/Ser363) антитело (Cell Signaling Technology, США), анти-фосфо-MSK1/2 (Ser376) антитело (Cell Signaling Technology, США), анти-фосфо-MNK1/2 (Thr197/202) антитело (Cell Signaling Technology, США), анти-фосфо-MAPKAPK-2 (Thr222) антитело (Cell Signaling Technology, США), анти-фосфо-cPLA2(Ser505) антитело (Cell Signaling Technology, США), анти-фосфо-cdc25(Ser216) антитело (Cell Signaling Technology, США), анти-фосфо-



Статмин(Ser16) антитело (Cell Signaling Technology, США), анти-фосфо-с-Myc (Thr58/Ser62) антитело (Cell Signaling Technology, США), анти-фосфо-n-Myc (Ser54) антитело (Bethyl Laboratories, США), анти-фосфо-Stat1 (Tyr701) антитело (Cell Signaling Technology, США), анти-фосфо-Stat3(Tyr705) антитело (Cell Signaling Technology, США), анти-фосфо-Elk-1 (Ser383) антитело (Cell Signaling Technology, США), анти-фосфо-с-Jun (Ser63) антитело (Cell Signaling Technology, США), анти-фосфо-с-Fos (Ser32) антитело (Cell Signaling Technology, США), анти-фосфо-UBF (Ser388) антитело (Santa Cruz Biotechnology, США), анти-фосфо-p53 (Ser15) антитело (Cell Signaling Technology, США), анти-фосфо-HMGN1 (Ser20/24) антитело (Abnova, Тайвань), анти-фосфо-eIF4E(Ser209) антитело (Cell Signaling Technology, США), анти-фосфо-eIF4B (Thr37/46) антитело (Cell Signaling Technology, США), анти-фосфо-IKK α/β (Ser180/181) антитело (Cell Signaling Technology, США), анти-фосфо-анти-Филамин А (Ser2152) антитело (Cell Signaling Technology, США), анти-фосфо-NF-kappaB p105/p50 (Ser337) антитело (GenScript, США), анти-фосфо-ATF4(Ser245) антитело (Abnova, Тайвань) и анти-фосфо-C/EBP β антитело (Thr235) (Cell Signaling Technology, США). PVDF мембрану отмывали фосфатно-солевым буферным раствором. Иммуно-реактивные банды выявляли с помощью набора реагентов LumiGLO (Cell Signaling Technology, США), согласно инструкции производителя. Подсохшую мембрану укладывали в кассету с пленкой для регистрации X-лучей Kodak X-Omat Blue Autoradiography Film (Kodak, Япония). Распределение ауто-радиографов белков на пленке документировали при помощи системы Polaroid Gel Documentation System (Bio-Rad, США), согласно инструкции производителя.

Количественная оценка содержания активных форм регуляторных энзимов

В клеточных экстрактах определяли уровень фосфорилированных форм MEK1/2

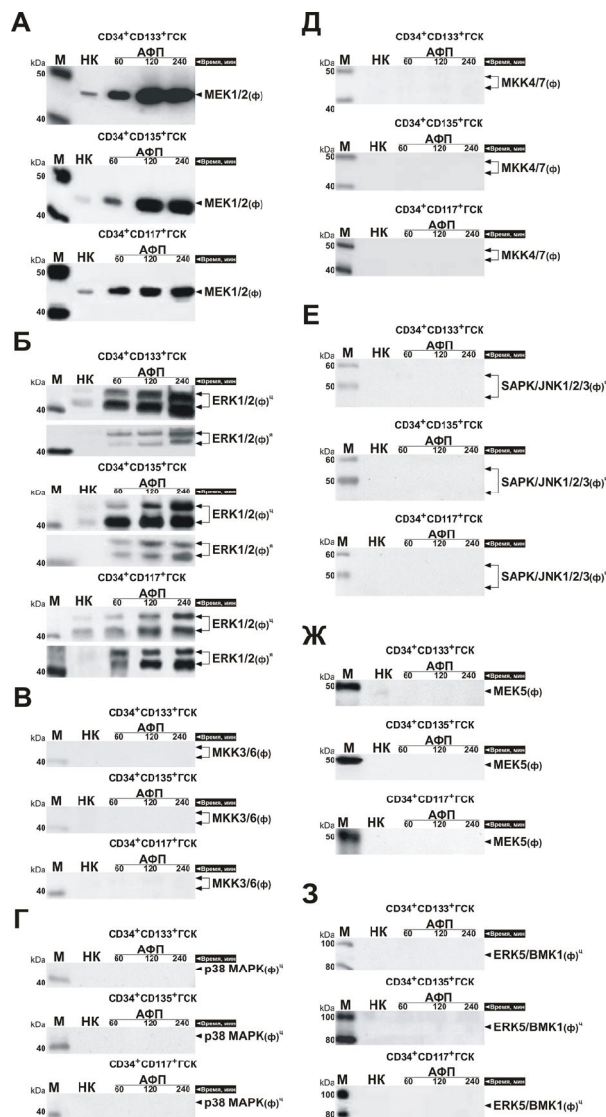
и ERK1/2 при помощи коммерческих наборов реагентов FACE MEK1/2 ELISA Kit (Active Motif, США) и Phospho-ERK1/ERK2 DuoSet IC ELISA Kit (R&D Systems, США), согласно инструкциям производителей.

Статистическая обработка данных

Качественные анализы проводили в трех независимых экспериментах в одной повторности. Количественные анализы проводили в трехкратной повторности в трех независимых экспериментах. Для всех численных данных высчитывалось среднее арифметическое значение (M) и средняя квадратичная ошибка (m). Коэффициент Стьюдента (t) использовался для выявления достоверности различий между экспериментальными значениями. Значения показателя достоверности $P > 0,05$ считали статистически не достоверными.

Результаты и обсуждение

На первом этапе исследований была изучена активация основных киназ известных на сегодняшний день MAPK сигнальных путей, а именно: MEK1/2, ERK1/2, MKK3/6, p38 MAPK, MKK4/7, SAPK/JNK1/2/3, MEK5 и ERK5/BMK1. MEK1/2 и ERK1/2 киназы были выбраны для изучения первыми исходя из того, что под воздействием АФП в цитоплазме всех изучаемых субпопуляций ГСК была выявлена фосфорилированная форма одного из основных регуляторов ERK каскада – B-Raf [25]. В результате было выявлено, что при воздействии АФП (50 мкг/мл) на субпопуляции ГСК костного мозга в них происходила активации обоих MEK1/2 и ERK1/2 киназ в цитоплазме, тогда как индукция других MAPK не выявлялась (рис. 1А и 1Б). Необходимо отметить, что фосфорилированная форма ERK1/2 была обнаружена и в нуклеоплазме всех трех субпопуляций АФП-индуцированных ГСК (рис. 1Б), следовательно, активированная форма ERK1/2 мигрирует в ядро ГСК под действием АФП. При этом, активация как MEK1/2, так и ERK1/2 имела четкую кинетику (рис. 1А и 1Б).

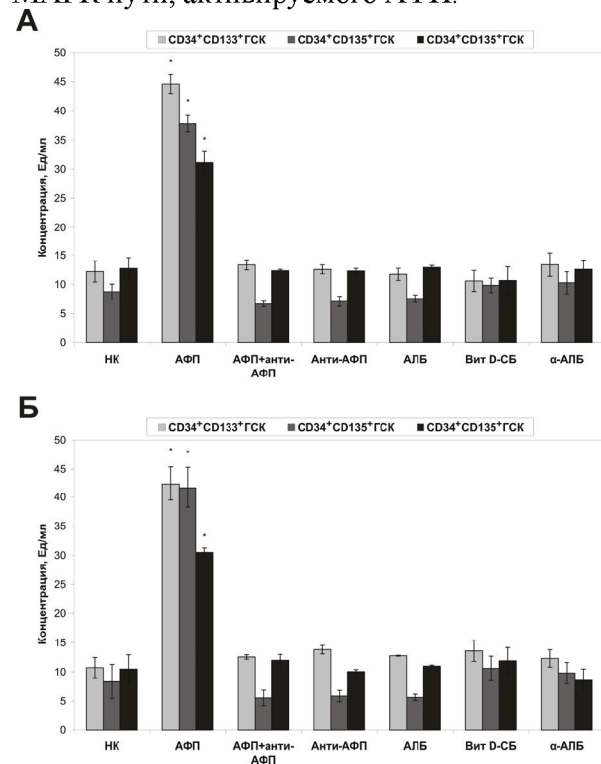


Обозначения: А – активация MEK1/2 в цитоплазме ГСК; Б – активация ERK1/2 в цитоплазме и ядре ГСК; В – активация MKK3/6 в цитоплазме ГСК; Г – активация p38 MAPK в цитоплазме ГСК; Д – активация MKK4/7 в цитоплазме ГСК; Е – активация SAPK/JNK1/2/3 в цитоплазме ГСК; Ж – активация MEK5 в цитоплазме ГСК; З – активация ERK5/BMK1 в цитоплазме ГСК; линия М – белковые маркеры; линия НК – негативный контроль; линии 60, 120 и 240 – АФП-индуцированные клетки через 60, 120 и 240 мин активации; (ф) – фосфорилированная форма; ц – цитоплазма; я – ядро.

Рис. 1. Влияние АФП на активацию основных MAPK сигнальных молекул в цитоплазме и нуклеоплазме трех субпопуляций ГСК костного мозга

Анализ специфичности активации выявленных MEK1/2 и ERK1/2 в цитозоле ГСК от АФП-индукции показал, что ни один из изученных представителей альбуминоидного семейства генов, в том числе АЛБ, являющийся наиболее гомологичным с АФП, не

продемонстрировал активирующего эффекта на данные MAPK, а анти-АФП (100 мкг/мл) полностью ингибировало индуцирующее действие АФП (рис. 2). Следовательно, активация обоих MEK1/2 и ERK1/2 киназ в цитозоле трех изучаемых ГСК костного мозга является специфичной для АФП среди всего семейства альбуминоидного семейства генов, несмотря на то, что для АЛБ может взаимодействовать с мембраной ГСК костного мозга и транспортироваться в цитозоль [37-39]. Это говорит о том, что выявленные MEK1/2 и ERK1/2 регуляторные элементы ГСК являются основными структурными элементами MAPK пути, активируемого АФП.



Обозначения: А – содержание активированной формы MEK1/2 в цитоплазме ГСК; Б – содержание активированной формы ERK1/2 в цитоплазме ГСК; Анти-АФП – поликлональное антитело против АФП; АЛБ – сывороточный альбумин; Вит D-СБ – витамин D-связывающий белок; α-АЛБ – альфа-альбумин; «*» – достоверность результатов в сравнении с контролем $P < 0,05$.

Рис. 2. Активация MEK1/2 и ERK1/2 киназ в цитоплазме трех субпопуляций ГСК костного мозга в присутствии АФП и других представителей альбуминоидного семейства генов

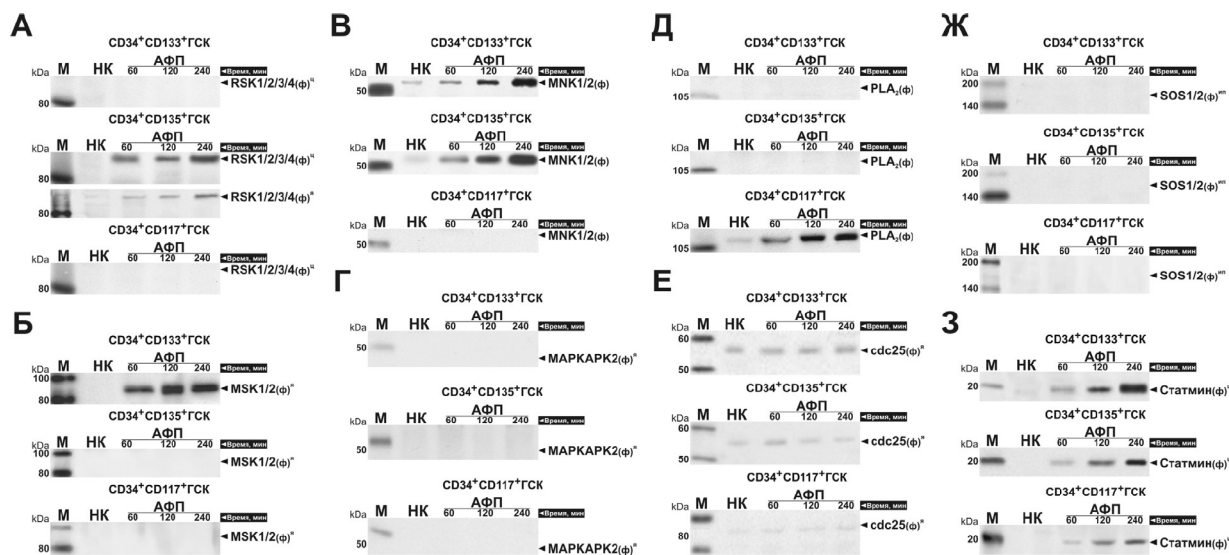
Более того, выявление данных MAPK во всех изученных типах ГСК, позволяет сделать предположение об универсальности типа



МАРК сигнальных каскадов, активируемых в ГСК, а также, возможно, и в других клетках, имеющих общее происхождение с ГСК или получаемых при их модификации. Подтверждением данного предположения является активация ERK1/2 в цитозоле АФП-индуцированных эндотелиоцитов [40], которые имеют с ГСК костного мозга общее филогенетическое начало [41].

На втором этапе исследований были изучены возможные цитоплазматические и ядерные сигнальные элементы МАРК пути, активность которых напрямую зависит от активации ERK1/2 (рис. 3 и 4). Исключение составили лишь киназа p70S6K и транскрипционный фактор SRF, АФП-индуцированное фосфорилирование которых было выявлено ранее в изучаемых субпопуляциях ГСК [25, 42]. В итоге, анализ ERK1/2-зависимых киназ и регуляторных факторов показал, что при действии АФП на CD34⁺CD133⁺ ГСК и CD34⁺CD135⁺ ГСК в их цитоплазме была обнаружена активированная форма MNK1/2 (рис. 3В). Взаимодействие АФП с CD34⁺CD133⁺ ГСК сопровождалось активацией MSK1/2 в нуклеоплазме (рис.

3Б). В CD34⁺CD135⁺ ГСК АФП индуцировал фосфорилирование RSK1/2/3/4 в цитозоле и ее миграцию в ядро (рис. 3А). В цитоплазме CD34⁺CD117⁺ ГСК наблюдалась активация PLA₂ (рис. 3Д). Общим для всех трех изучаемых субпопуляций ГСК стал регуляторный фактор клеточного цикла Статмин, фосфорилирование которого наблюдалось в их цитоплазме (рис. 3З). Важно отметить, что, как и в случае с основными киназами MEK1/2 и ERK1/2, активация выявленных ERK1/2-зависимых киназ и регуляторных факторов имела строгую кинетику (рис. 3). Анализ ERK1/2-зависимых транскрипционных факторов выявил следующее. В нуклеоплазме АФП-индуцированных CD34⁺CD133⁺ ГСК происходило фосфорилирование таких факторов транскрипции как Stat3, Sap1/2, c-Jun и Erg-1, а также факторов биогенеза рибосом BRF1 и UBF (рис. 4Г, 4Е, 4К, 4М-4О). В CD34⁺CD135⁺ ГСК АФП индуцировал активацию транскрипционных факторов Stat3, Elk1, c-Fos, c-Jun и Erg-1, также как и факторов биогенеза рибосом BRF1 и UBF (рис. 4Г, 4З, 4И, 4К, 4М-4О). Однако на



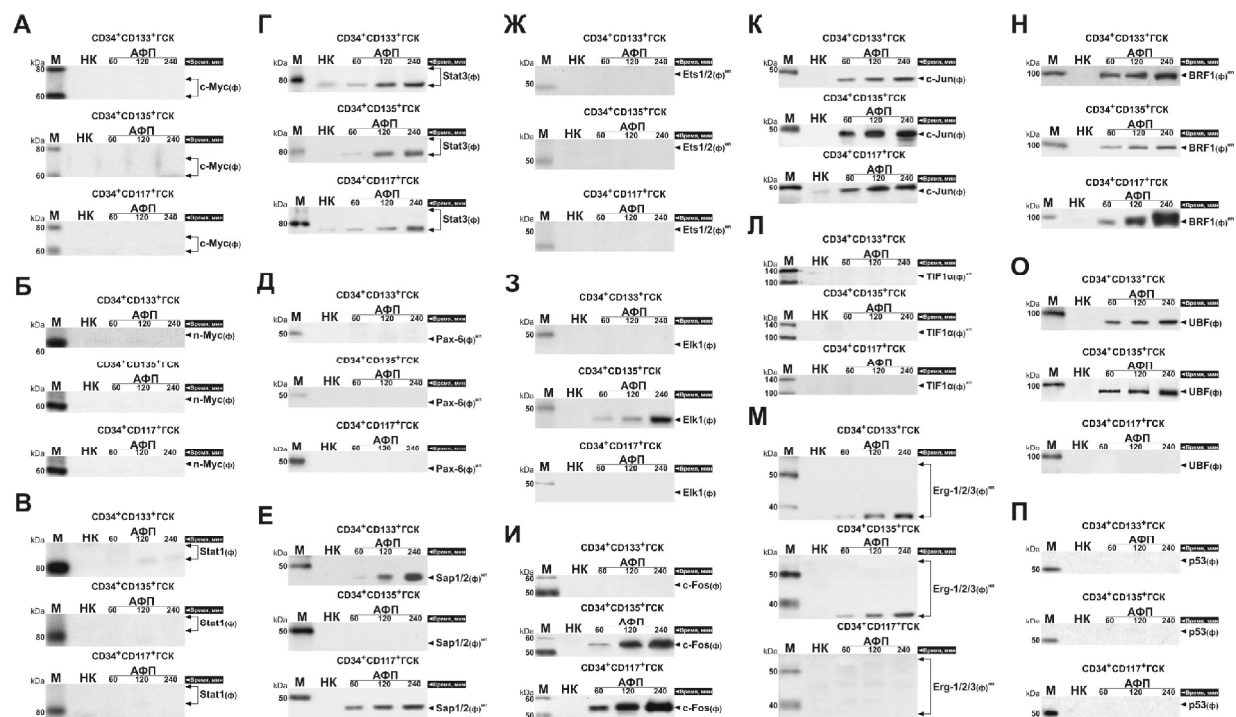
Обозначения: А – активация RSK1/2/3/4 в цитоплазме и нуклеоплазме ГСК; Б – активация MSK1/2 в нуклеоплазме ГСК; В – активация MNK1/2 в цитоплазме ГСК; Г – активация MARKAPK2 в нуклеоплазме ГСК; Д – активация PLA₂ в цитоплазме ГСК; Е – активация cdc25 в нуклеоплазме ГСК; Ж – активация SOS1/2 в цитоплазме ГСК; З – активация Статмина в цитоплазме ГСК; линия М - белковые маркеры; линия НК – негативный контроль; линии 60, 120 и 240 - АФП-индуцированные клетки через 60, 120 и 240 мин активации; (ф) – фосфорилированная форма; ц – цитоплазма; я – ядро; ип - иммунопреципитация.

Рис. 3. Влияние АФП на активацию ERK1/2-зависимых киназ и регуляторных факторов в цитоплазме и нуклеоплазме трех субпопуляций ГСК костного мозга



активацию c-Fos и c-Jun может оказывать влияние фосфорилированная форма RSK [28, 29], которая, как и ERK1/2, была выявлена в ядре CD34⁺CD135⁺ ГСК (рис. 8). В АФП-индуцированных CD34⁺CD135⁺ ГСК наблюдалось фосфорилирование следующих транскрипционных факторов: Stat3, Sap1/2, c-Fos, c-Jun и Erg-1 (рис. 4Г, 4Е, 4И, 4К, 4М). В нуклеоплазме данной субпопуляции ГСК обнаруживалась активная форма фактора

биогенеза рибосом BRF1 (рис. 4О). Что касается других ERK1/2-активируемых мишеней в цитоплазме и ядре изучаемых ГСК, то АФП-зависимых изменений в их активации выявлено не было (рис. 3 и 4). Важно отметить, что, как и в случае с основными киназами MEK1/2 и ERK1/2, активация выявленных ERK1/2-зависимых киназ, регуляторных и транскрипционных факторов имела строгую кинетику (рис. 3 и 4).



Обозначения: А – активация c-Мус в ГСК; Б – активация n-Мус в ГСК; В – активация Stat1 в ГСК; Г – активация Stat3 в ГСК; Д – активация Pax6 в ГСК; Е – активация Sap1/2 в ГСК; Ж – активация Ets1/2 в ГСК; З – активация Elk1 в ГСК; И – активация c-Fos в ГСК; К – активация c-Jun в ГСК; Л – активация TIF1α в ГСК; М – активация Erg-1/2/3 в ГСК; Н – активация BRF1 в ГСК; О – активация UBF в ГСК; П – активация p53 в ГСК; линия М - белковые маркеры; линия НК – негативный контроль; линии 60, 120 и 240 - АФП-индуцированные клетки через 60, 120 и 240 мин активации; (ф) – фосфорилированная форма; ип - иммунопреципитация.

Рис. 4. Влияние АФП на активацию ERK1/2-зависимых транскрипционных факторов и факторов биогенеза рибосом в нуклеоплазме трех субпопуляций ГСК костного мозга

На третьем этапе были изучены прямые мишени киназ MSK1/2, MNK1/2 и RSK1/2/3/4 в цитоплазме и нуклеоплазме, соответствующих субпопуляций ГСК (рис. 5). В результате, из рисунка 5А видно, что в ядре АФП-индуцированных CD34⁺CD133⁺ ГСК не было выявлено активации ни транскрипционного фактора HMGN1, ни ETV1 – прямых мишеней MSK1/2. Ранее в нуклеоплазме данной субпопуляции ГСК были показаны фосфорилированные формы транскрипционных факторов CREB, ATF-1 и

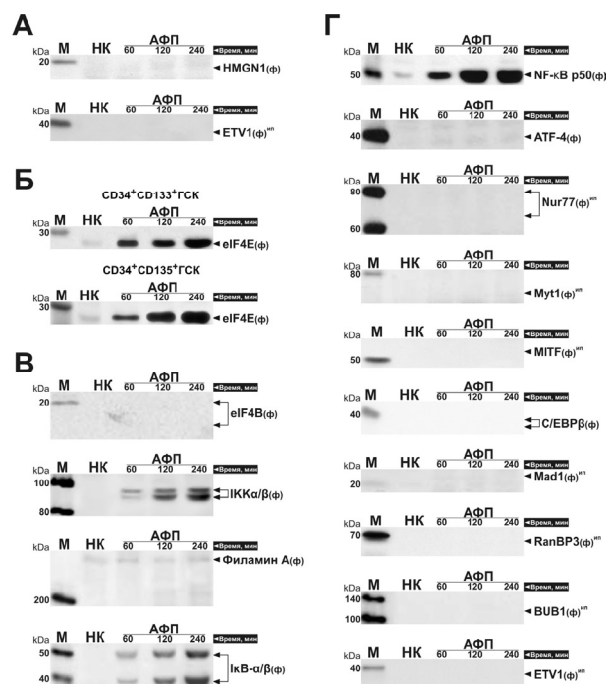
гистона H3 [25, 42], которые также являются прямыми мишенями MSK1/2 в ряде других типов клеток [28, 29]. В цитоплазме обоих АФП-индуцированных CD34⁺CD133⁺ ГСК и CD34⁺CD135⁺ ГСК была выявлена единственная мишень MNK1/2 – фактор регуляции трансляции eIF4E (рис. 5Б). Что касается мишеней RSK1/2/3/4, то в цитоплазме были выявлены две его мишени – киназа IKKα/β и белок IκB-αβ, в то время как других прямых RSK-активируемых мишеней не было обнаружено (рис. 5В).



Однако RSK1/2/3/4, потенциально [28], мог принимать участие в фосфорилировании S6 белка рибосом и регуляторного фактора BAD, активация которых была выявлена ранее в нуклеоплазме АФП-индуцированных CD34⁺CD135⁺ ГСК [25]. В нуклеоплазме CD34⁺CD135⁺ ГСК была обнаружена лишь активная форма транскрипционного фактора NF-κB p50 (рис. 5B), опосредованной мишени RSK1/2/3/4 – продукта реакции, запускаемой киназой IKKα/β [43]. Возможно, что в число прямых мишеней RSK1/2/3/4 в нуклеоплазме CD34⁺CD135⁺ ГСК входят транскрипционные факторы c-Fos (рис. 4K), а также CREB, ATF-2, SRF и NF-κB p65 АФП-индуцированное фосфорилирование которых было доказано ранее [25, 42]. Кроме того, очевидно, что RSK1/2/3/4 не принимал участие в фосфорилировании транскрипционного фактора TIF1α, так как его фосфорилированная форма не была обнаружена в нуклеоплазме CD34⁺CD135⁺ ГСК в ходе изучения мишеней киназы ERK1/2 (рис. 4Л). Гистон H3, аналогично фактору TIF1A, не мог быть мишенью RSK1/2/3/4, поскольку его фосфорилированная форма в нуклеоплазме АФП-индуцированных CD34⁺CD135⁺ ГСК была не выявлена [25].

Таким образом, в цитоплазме и нуклеоплазме трех различных типов ГСК костного мозга, при их индукции АФП в условиях *in vitro*, обнаруживаются как активные формы основных киназ, так и активные формы подчиненных киназ и регуляторных факторов ERK типа MAPK сигнальных путей. Это позволяет говорить о возможном функционировании данного типа MAPK каскадов в качестве ветви

молекулярного механизма действия АФП в ГСК костного мозга.



Обозначения: А – активация MSK1/2-зависимых сигнальных элементов в нуклеоплазме CD34⁺CD133⁺ ГСК; Б – активация MNK1/2-зависимых сигнальных элементов в цитоплазме CD34⁺CD133⁺ и CD34⁺CD135⁺ ГСК; В – активация RSK1/2/3/4-зависимых сигнальных элементов в цитоплазме CD34⁺CD135⁺ ГСК; Г – активация RSK1/2/3/4-зависимых сигнальных элементов в нуклеоплазме CD34⁺CD135⁺ ГСК; линия М – белковые маркеры; линия НК – негативный контроль; линии 60, 120 и 240 – АФП-индуцированные клетки через 60, 120 и 240 мин активации; (ф) – фосфорилированная форма; ип – иммунопреципитация.

Рис. 5. Влияние АФП на активацию MSK1/2-, MNK1/2- и RSK1/2/3/4-зависимых сигнальных элементов в цитоплазме и нуклеоплазме трех субпопуляций ГСК костного мозга

Литература

1. Mizejewski G.J. Biological roles of alpha-fetoprotein during pregnancy and perinatal development // Exp. Biol. Med. - 2004. - Vol. 229. - P. 439-463.
2. Yin Z.F., Wang C.H. Research advances on alpha-fetoprotein physiological function and clinical potential // Ai Zheng. - 2003. - Vol. 22. - P. 108-121.
3. Mizejewski G.J. Alpha-fetoprotein as a biologic response modifier: Relevance to domain and subdomain structure // Proc. Soc. Exp. Biol. Med. - 1997. - Vol. 215. - P. 333-362.



4. Sell S., Becker F.F., Leffert H.L., Watabe L. Expression of an oncodevelopmental gene product (alpha-fetoprotein) during fetal development and adult oncogenesis // *Cancer Res.* - 1976. - Vol. 36. - P. 4239-4249.
5. Trojan J., Uriel J. Immunocytochemical localization of alpha-fetoprotein (AFP) and serum albumin (ALB) in ecto-, meso- and endodermal tissue derivatives of the developing rat // *Oncodev. Biol. Med.* - 1982. - Vol. 3. - P. 13-22.
6. Mares V., Kovaru F., Kovaru H. Alpha-fetoprotein in the brain of developing rats and pigs. An immunofluorescent study of cell-and-tissue differentiation // *Basic Appl. Histochem.* - 1982. - Vol. 261. - P. 53-63.
7. Ruoslahti E., Seppala M. Alpha-Fetoprotein in cancer and fetal development. // *Adv. Cancer Res.* - 1979. - Vol. 29. - P. 275-234.
8. Gabant P., Forrester L., Nichols J., van Reeth T., de Mees C., Pajack B., Watt A., Smits J., Alexandre H., Szpirer C., Szpirer J. Alpha-fetoprotein, the major fetal serum protein, is not essential for embryonic development but is required for female fertility // *Proc. Natl. Acad. Sci.* - 2002. - Vol. 99. - P. 12865-12870.
9. Gillespie J.R., Uversky V.N. Structure and function of alpha-fetoprotein: a biophysical review // *Biochim. Biophys. Acta.* - 2000. - Vol. 1480. - P. 41-56.
10. Chen H., Egan J., Chiu J.F. Regulation and activities of alpha-fetoprotein // *Crit. Rev. Eukaryot. Gene. Exp.* - 1997. - Vol. 7. - P. 11-41.
11. Mizejewski G. Levels of AFP during pregnancy and early infancy in normal and disease states // *Obstet. Gynecol. Surv.* - 2003. - Vol. 58. - P. 17-35.
12. Dudich E., Semenкова L., Gorbatoва E., Dudich I., Khromykh L., Tatulov E., Grechko G., Sukhikh G. Growth-regulative activity of human alpha-fetoprotein for different types of tumor and normal cells // *Tumor Biol.* - 1988. - Vol. 19. - P. 30-40.
13. Toder V., Bland M., Gold-Geftor L., Nebel J. The effect of alpha-fetoprotein on the growth of placental cells *in vitro* // *Placenta.* - 1983. - Vol. 4. - P. 79-86.
14. Keel B.A., Eddy K.B., Cho S., Gangrade B.K., May J.V. Purified human alpha fetoprotein inhibits growth factor-stimulated estradiol production by porcine granulosa cells in monolayer culture // *Endocrinology.* - 1992. - Vol. 130. - P. 3715-3717.
15. Leffert H.I., Sell S. Alpha-fetoprotein biosynthesis during the growth cycle of differentiated fetal rat hepatocytes in primary monolayer culture // *J. Cell. Biol.* - 1974. - Vol. 61. - P. 823-829.
16. Hamel S., Hoskin D.W., Hooper D.C., Murgita R.A. Phenotype and function of bone marrow-derived T and non-T cells activated *in vitro* by alpha-fetoprotein // In Mizejewski G.J., Jacobson H.I., Eds. *Biological Activities of Alpha-Fetoprotein.* - Boca Raton: CRC Press, 1987. - P. 167-177.
17. Scrova I.A., Yunker V.M., Kaledin V.I. High levels of alpha-fetoprotein and persistence of hemopoiesis in the liver of nude mice // *Oncodev. Biol. Med.* - 1982. - Vol. 3. - P. 351-363.
18. Hwang S.J., Lee S.D., Wu J.C. Clinical evaluation of erythrocytosis in patients with hepatocellular carcinoma // *Chuang. Hua. Hsueh. Tsa. Chih. Tapei.* - 1994. - Vol. 53. - P. 262-269.
19. Sakisaka S., Watanabe M., Tateishi H., Harada M., Shakado S. Erythropoietin production in hepatocellular carcinoma cells associated with polycythemia: Immunohistochemical evidence // *Hepatology.* - 1993. - Vol. 18. - P.1357-1362.
20. Bartha J.L., Romero-Carmona R., Comino-Delgado R., Arce F., Arrabal J. Alpha-fetoprotein and hematopoietic growth factors in amniotic fluid // *Obstet. Gynecol.* - 2000. - Vol.96. - P. 588-592.
21. Bartha J.L., Comino-Delgado R., Arce F., Alba P., Broouillon J.P., Manel B.M. Relationship between alpha-fetoprotein and fetal hematopoiesis // *J. Reprod. Med.* - 1994. - Vol.44. - P. 689-697.
22. Рыбакова Т.М., Фомичева Е.В., Дубешко С.Ю., Беляев Н.Н., Богданов А.Ю. Влияние альфа-фетопротейна на биологическую активность гемопоэтических стволовых клеток в условиях *ex vivo* I: воздействие на ростовой потенциал // *Биотех. Теор. Практ.* - 2007. - №1. - С.76-91.
23. Рыбакова Т.М., Низкородова А.С., Жигайлов А.В., Беляев Н.Н., Богданов А.Ю. Влияние альфа-фетопротейна на биологическую активность гемопоэтических стволовых клеток в условиях *ex vivo* II: воздействие на экспрессию и продукцию супрессорных факторов, клоногенную активность, самоподдержание и дифференциацию // *Биотех. Теор. Практ.* - 2007. - №1. - С. 92-114.



24. Богданова Т.М. Активация стволовых гемопоэтических клеток альфа-фетопротеином: молекулярная организация путей сигнальной трансдукции: Автореф. ...канд. биол. наук. – Алматы, 2010. – 22 с.
25. Богданова Т.М., Рыбакова Е.В., Дубешко С.Ю., Бедарева Т.Е., Беляев Н.Н., Кулманов М.Е., Богданов А.Ю. Структура цАМФ-зависимых сигнальных путей, вовлеченных в передачу регуляторного импульса альфа-фетопротеина в гемопоэтических стволовых клетках костного мозга // Здор. и Болез. - 2009. - №6. - С.120-143.
26. Богданова Т.М., Богданов А.Ю., Беляев Н.Н. Анализ вторичных мессенджеров в функциональной активности гемопоэтических стволовых клеток при их индукции альфа-фетопротеином // Биотех. Теор. Практик. - 2008. - №1. - С. 50-68.
27. Рыбакова Е.В., Кулманов М.Е., Богданов А.Ю. Активация Ca^{2+} - и цАМФ-зависимых сигнальных путей передачи сигнала в гемопоэтических стволовых клетках костного мозга АФП-инъектированных животных // Вестник КазНУ. Сер. экол. – 2010. – №1. - С. 10-20.
28. Cobb M.H. MAP kinase pathways // Prog. Biophys. Mol. Biol. – 1999. – Vol. 71. - P.479-500.
29. Pearson G., Robinson F., Gibson T.B., Xu B., Karandikar M., Berman K., Cobb M.H. Mitogen-Activated Protein (MAP) kinase pathways: Regulation and physiological functions // Endoc. Rev. – 2001. - Vol. 22. - P. 153-183.
30. Binétruy B., Heasley L., Bost F., Caron L., Aouadli M. Regulation of embryonic stem cell lineage commitment by mitogen-activated protein kinases // Stem Cells. – 2007. – Vol. 25. – P. 1090-1105.
31. Dreesen O., Brivanlou A.H. Signaling pathways in cancer and embryonic stem cells // Stem. Cell. Rev. – 2007. – Vol. 3. - P. 7-17.
32. Geest C.R., Coffey P.J. MAPK signaling pathways in the regulation of hematopoiesis // J. Leukoc. Biol. – 2009. – Vol. 86. - P. 237-250.
33. Sugiura K., Ikehara S., Inaba M. Enrichment of murine bone marrow natural suppressor activity in the fraction of hematopoietic progenitors with interleukin-3 receptor-associated antigen // Experim. Hematol. – 1992. – Vol. 20. – P. 256-263.
34. Закирьянова Г.К., Беляев Н.Н. Изопикническое разделение клеток костного мозга // Методы молекул. биол. биохим. иммунохим. биотех. – Алматы: Гридан, 1999. - С.175-178.
35. Богданов А.Ю., Саввулиди Ф.Г. Тлеулиева Р.Т., Беляев Н.Н. Альфа-фетопротеин как индуктор натуральных супрессорных (NS) клеток костного мозга I. Изотипические фракции NS-клеток и их супрессорные эффекты // Биотех. Теор. Практик. – 2004. – № 3. - С.83-89.
36. Rosenberg I.M. Protein analysis and Purification. – Boston: Birkhäuser. 1996. - 434p.
37. Abelev G.I. Alpha-Fetoprotein as a marker of embryo-specific differentiations in normal and tumor tissues // Transplant. Reviews. - 1974. - Vol. 20. - P. 3-37.
38. Laborda J., Naval J., Calvo M., Lampreave F., Uriel J. Alpha-fetoprotein and albumin uptake by mouse tissues during development // J. Biol. Neonate. – 1991. - Vol. 56. - P. 332-341.
39. de Velde E.A., Exalto N., Hesseling P., van Linden H.C. First trimester development of human chorionic villous vascularization studied with CD34 immunohistochemistry // Human Reprod. - 1997. - Vol. 12. - P. 1577-1581.
40. Liang O.D., Korff T., Eckhardt J., Rifaat J., Baal N., Herr F., Preissner K.T., Zygmunt M. Oncodevelopmental α -fetoprotein acts as a selective proangiogenic factor on endothelial cell from thefetomaternal unit // J. Clin. Endocrinol. Metab. - 2004. - Vol. 89. - P. 1415-1422.
41. Asahara T. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis // Science. - 1997. – Vol. 275. - P. 964-977.
42. Богданова Т.М., Рыбакова Е.В., Фомичева Е.В., Калыкова А.С., Бедарева Т.Е., Беляев Н.Н., Богданов А.Ю. Структура Ca^{2+} -зависимых сигнальных путей, вовлеченных в передачу регуляторного сигнала альфа-фетопротеина в гемопоэтических стволовых клетках костного мозга // Здор. и Болез. - 2008. - №6. - С.121-138.
43. Perkins N.D. Integrating cell-signalling pathways with NF- κ B and IKK function // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. – 2007. – Vol. 8. - P. 49-62.



Түйін

Бұл жұмыста *in vitro* сүйек кемігінің АФП-белсендендірілген CD34+CD133+, CD34+CD135+ және CD34+CD117+ ГБЖ мысалында MAPK каскадтарының сигналдық молекулаларының активациясы зерттелді. Нәтижесінде АФП зерттелген ГБЖ барлық субпопуляцияларындағы MEK1/2 және оның нысанасы ERK1/2 фосфорлануын арнайы белсендендіретіні көрсетілді. Өз кезегінде, ERK1/2 нысанылары әртүрлі болды. CD34+CD133+ ГБЖ цитоплазмасында MNK1/2 және Статмин жасушалық циклының реттеуші факторының белсенді түрлері табылды. CD34+CD133+ ГБЖ нуклеоплазмасында MSK1/2, Stat3, Sap1/2, c-Jun және Erg-1 транскрипциялық факторларының, сонымен қатар BRF1 және UBF рибосомалардың биогенезі факторларының белсенді түрлері анықталды. CD34+CD135+ ГБЖ цитоплазмасында RSK1/2/3/4, MNK1/2 және Статминнің белсенді түрлері табылды. CD34+CD135+ ГБЖ ядросында RSK1/2/3/4 киназасының, Stat3, Elk-1, c-Fos, c-Jun, Erg-1 транскрипциялық факторларының және BRF1 және UBF рибосомалардың биогенезі факторларының фосфорланған түрлері анықталды. CD34+CD117+ ГБЖ цитоплазмасында PLA2 және Статминнің фосфорланған түрлері көрсетілді. Ядрода Stat3, Sap1/2, c-Fos, c-Jun, Erg-1 транскрипциялық факторларының және BRF1 рибосомалардың биогенезі факторының белсенді түрлері байқалды. Сонымен, *in vitro* жағдайында АФП индукциясы кезінде сүйек кемігінің үш типті ГБЖ цитоплазмасы мен нуклеоплазмасында негізгі киназалардың да, бағынышты киназалардың да, сонымен бірге MAPK белгі беру жолдарының ERK типті реттеуші факторларының да белсенді формалары анықталды. Бұл MAPK каскадтарының аталған типінің сүйек кемігі ГБЖ АФП әсерінің молекулалық механизмінің бір тармағы ретінде қызмет етуін болжамдауға мүмкіндік береді.

Summary

The present study is devoted to activation of signaling molecules of MARK cascades in bone marrow HSCs in regard to CD34+CD133+, CD34+CD135+ и CD34+CD117+ HSC subpopulations in the course of their AFP-stimuli *in vitro*. As a result, AFP is detected to induce specific phosphorylation of MEK1/2 and its ERK1/2 target in all known HSC subpopulation. In its turn, the ERK1/2 targets are different. So, the activated form of MNK1/2 and cell cycle regulatory factor Stathmin is indicated in cytoplasm of CD34+CD133+ HSCs. The activated MSK1/2 form of transcriptional factors Stat3, Sap1/2, c-Jun and Erg-1, as well as ribosome biogenesis factors BRF1 and UBF are detected in nucleoplasm of CD34+CD133+ HSCs. The activated forms of RSK1/2/3/4, MNK1/2 and Stathmin were detected in cytoplasm of CD34+CD135+ HSCs. In CD34+CD135+ HSCs nucleus of were detected phosphorylated forms of RSK1/2/3/4 kinase and transcriptional factors Stat3, Elk-1, c-Fos, c-Jun, Erg-1 and ribosome biogenesis factors BRF1 and UBF. The phosphorylated form of PLA2 and Stathmin is indicated in cytoplasm of CD34+CD117+ HSCs. The activated forms of transcriptional factors Stat3, Sap1/2, c-Fos, c-Jun and Erg-1 as well as the ribosome biogenesis factor BRF1 are detected in nucleus. Thus, both active forms of basic and downstream kinases as well as downstream regulatory factors of ERK type of MARK signaling pathways are detected in different types of bone marrow HSCs under AFP induction *in vitro*. That enables to say of a possibility of functioning of the given type of MARK cascades as a molecular mechanism pathway of AFP efficacy in bone marrow HSCs.