



УДК 577.27; 612.017.1:616-006

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ СИГНАЛЬНЫХ МОЛЕКУЛ МАРК КАСКАДОВ В ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТКАХ КОСТНОГО МОЗГА В ХОДЕ ПЕРЕДАЧИ РЕГУЛЯТОРНОГО СИГНАЛА АЛЬФА-ФЕТОПРОТЕИНА *IN VITRO*

А.Ю. Богданов¹, Т.М. Богданова¹, Т.А. Супниязова¹, Н.А. Айтхожина²

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

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

В данной работе было изучено взаимодействие выявленных сигнальных молекул ERK1/2 типа МАРК каскадов в ГСК костного мозга на примере CD34⁺CD133⁺, CD34⁺CD135⁺ и CD34⁺CD133⁺ ГСК в ходе их АФП-стимула *in vitro*. В результате было показано, что АФП-индуцированное фосфорилирование ERK1/2 в большей степени зависело от MEK1/2-опосредованной активации B-Raf. В свою очередь ERK1/2 являлась единственным индуктором MNK1/2 в CD34⁺CD133⁺ ГСК и CD34⁺CD135⁺ ГСК, MSK1/2 в CD34⁺CD133⁺ ГСК, RSK1/2/3/4 в CD34⁺CD135⁺ ГСК и PLA₂ в CD34⁺CD117⁺ ГСК. В противоположность этому, активация Статмина и p70S6K была частично зависимой от ERK1/2 во всех изученных субпопуляциях ГСК. Анализ фосфорилирования регуляторных факторов в нуклеоплазме показал, что Stat3, Sap1/2, Elk-1, c-Fos, c-Jun и Erg-1, также как BRF1 и UBF являлась полностью ERK1/2-опосредованной. Изучение мишеней ERK1/2-зависимых киназ выявило, что MNK1/2 являлась единственным индуктором eIF4E, в то время как ингибирование MSK1/2 приводило к полному подавлению фосфорилирования только гистона H3, а активация ATF-1 и CREB подавлялась частично. Ингибирование RSK1/2/3/4 привело к полному подавлению фосфорилирования только IKK α/β и, соответственно, зависимой от нее активации NF- κ B p50. Что касается BAD, NF- κ B p65, CREB, SRF и ATF-2, то в их фосфорилировании RSK1/2/3/4 принимала частичное участие. Аналогичная ситуация наблюдалась и в случаях c-Fos и pS6, так как в данном процессе вторыми индукторами были ERK1/2 и p70S6K. Все эти данные позволяют заключить, что под действием АФП в трех различных субпопуляциях ГСК костного мозга функционирует ERK1/2 сигнальный каскад.

Введение

Среди белков альбуминоидного семейства генов АФП является главным белком эмбриональной сыворотки, играющим ключевую роль в переносе многочисленных лигандов в эмбриональные клетки и ткани [1-5]. При этом взаимодействие и проникновение АФП было выявлено в клетках всех эндо-, мезо- и эктодермальных тканей эмбриона и плода птиц и млекопитающих [6-8]. В дальнейших работах по выяснению роли АФП в онтогенезе был выявлен ряд других, не менее важных направлений его действия. Так, во время закладки нервной системы АФП является главным фактором, участвующим в формировании нервной трубки [7, 9, 10]. На более поздних этапах онтогенеза АФП играет важную роль в развитии репродуктивной системы, становлении взаимосвязей гипоталамо-гипофизарной системы

с развивающимися органами, в развитии и формировании печени, поджелудочной железы, мышц и мочевыводящей системы [5, 11-15]. Рядом независимых исследований было доказано, что АФП, присутствующий в развивающейся мозговой ткани, также играет важную роль в дифференциации нейронов, нейроглии и в развитии целых структур головного мозга [5, 7, 13, 16]. Помимо этого, показана важная роль АФП в регуляции гемопоеза в развивающемся плоде, который, как и сам синтез АФП, начинается в желточном мешке и фетальной печени [5, 15, 17]. Так, выявлена прямая корреляция активации гемопоеза и повышения уровня АФП у пациентов с гепатомой, причем поддержание высокого уровня продукции АФП напрямую коррелировало с наличием и активностью очагов гемопоеза в печени [18, 19]. В своих работах J. Vartha 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 продукцию супрессорных факторов данных типов ГСК. При этом исследование молекулярных механизмов данного регуляторного действия АФП на ГСК выявило, что цАМФ-зависимые сигнальные каскады активируют регуляторный белок B-Raf, который в свою очередь являлся индуктором ERK1/2 типа MAPK сигнальных каскадов [25]. В цитоплазме и ядре изученных субпопуляций ГСК были обнаружены различные многочисленные мишени ERK1/2 и ERK1/2-зависимых киназ [25], но вопросы об их взаимосвязи между собой и взаимной регуляции активности подчиненных сигнальных белков в ходе реализации АФП-стимула в ГСК костного мозга остаются открытыми. Понимание данных вопросов 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 ERK1/2 сигнальный каскад является одним из главных молекулярных механизмов в эмбриональных и ткане-специфических стволовых клетках, ответственных за генерацию их функций [29-32]. Понимание структуры ERK1/2-зависимых 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 внутренняя взаимосвязь выявленных ERK1/2-зависимых сигнальных молекул и целостная структура ERK1/2-зависимого каскада, активирующегося в ходе АФП-стимула ГСК костного мозга на примере $CD34^+CD133^+$, $CD34^+CD135^+$ и $CD34^+CD133^+$ ГСК в условиях *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 mM L-глутамин, 100 мг/мл стрептомицин 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 ряде случаев перед добавлением АФП к суспензиям клеток их предварительно культивировали в течение 6 ч в присутствии: 1,8×10⁻⁵ М ингибитора BAY43-9006 (Enzo

Life Sciences, США), 2,5×10⁻¹¹ М ингибитора SL 327 (Biaffin GmbH, Германия), 2,5×10⁻⁷ М ингибитора ERK1Inh (Calbiochem, Великобритания), 3,0×10⁻⁶ М ингибитора CGP57380 (Sigma, США), 2×10⁻⁶ М ингибитора ML-9 (Biaffin GmbH, Германия), 3,5×10⁻⁵ М ингибитора SL0101 (Calbiochem, Великобритания) или 2,0×10⁻⁷ М ингибитора IKK16 (Tocris Bioscience, США). В некоторых экспериментах использовали комбинацию 3,5×10⁻⁵ М ингибитора SL0101 и 9,0×10⁻¹¹ М ингибитора SL-2052 (Tocris Bioscience, США). Негативным контролем являлся раствор Хэнкса (Sigma, США). Клетки инкубировали с АФП 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 сушилки Integrated SpeedVac Systems SPD2010 (Thermo Savant, Финляндия) и хранили при -86°C. Образцы разводили в 2 мл фосфатного буфера.

Иммунопреципитация

При проведении иммунопреципитации использовали не диализированные 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-Сепфарозы (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 фор-



ме изучаемого сигнального белка в соотношении 1:1 и 100 мкл суспензии протеин G-Сефарозы (Amersham Biosciences, Швеция) [36]. В экспериментах использовали следующие антитела: анти-Sap1/2 антитело (Santa Cruz Biotechnology, США), анти-Erg1/2/3 антитело (Santa Cruz Biotechnology, США) и анти-BRF1 антитело (Santa Cruz Biotechnology, 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 мМ Трис-HCl буфер с pH 8,0 (Sigma, США), содержащий 0,5 М NaCl (Sigma, США), 5,0 мМ 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 М 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 мембра-

ну 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-cPLA2 (Ser505) антитело (Cell Signaling Technology, США), анти-фосфо-Статмин (Ser16) антитело (Cell Signaling Technology, США), анти-фосфо-UBF (Ser 388) антитело (Santa Cruz Biotechnology, США), анти-фосфо-eIF4E(Ser209) антитело (Cell Signaling Technology, США), анти-фосфо-Гистон H3 (Ser10) антитело (Cell Signaling Technology, США), анти-фосфо-S6 (Ser235/236) антитело (Cell Signaling Technology, США), анти-фосфо-SRF (Ser103) антитело (Cell Signaling Technology, США), анти-фосфо-BAD (Ser112) антитело (Cell Signaling Technology, США), анти-фосфо-IκB-α (Ser32) антитело (Cell Signaling Technology, США) и анти-фосфо-IκB-β (Ser19/23) антитело (Cell Signaling Technology, США). PVDF мембрану отмывали фосфатно-солевым буферным раствором. Иммунореактивные 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 автордиографов белков на пленке документировали при помощи системы Polaroid Gel Documentation System (Bio-Rad, США), согласно инструкции производителя.



Количественная оценка активности и содержания активных форм регуляторных энзимов

В клеточных экстрактах определяли уровень активности RSK1/2/3/4, p70S6K и IKK α/β а также фосфорилированных форм MEK1/2, ERK1/2, MSK1/2 и MNK1/2 при помощи коммерческих наборов реагентов p90S6 Kinase Assay Kit (Upstate, США), p70S6 Kinase Assay Kit (Upstate, США), IKK α/β Assay Screening Kit (Abnova, Тайвань), FACE MEK1/2 ELISA Kit (Active Motif, США), Phospho-ERK1/ERK2 DuoSet IC ELISA Kit (R&D Systems, США), QTL Lightspeed MSK1/2 Assay Kit (QTL Biosystems, USA) и Phospho-MNK ELISA Kit (Caltagmedsystems, Великобритания), согласно инструкциям производителей.

Количественная оценка содержания активных форм факторов транскрипции

В клеточных экстрактах определяли уровень фосфорилированных форм транскрипционных факторов Stat3, Elk1, c-Fos, c-Jun, CREB, ATF-1, ATF-2, NF- κ B p50 и NF- κ B p65 при помощи коммерческих наборов реагентов TransAM STAT Family (Active Motif, США), TransAM Elk-1 (Active Motif, США), TransAM AP-1 (Active Motif, США), TransAM CREB Assay Kit (Active Motif, США), ATF-1 ELISA Kit (USCN LIFE, Китай), TransAM ATF-2 Assay Kit (Active Motif, США) и TransAM NF- κ B Family Assay Kit (Active Motif, 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

Использование ингибитора B-Raf (BAY43-9006) привело к полной редукции АФП индуцирующего эффекта на MEK1/2, что подтверждает ее зависимость от АФП-индуцируемой активации B-Raf в цитозоле (таблица 1).

Использование ингибитора MEK (SL 327) привело к частичной (от 53 до 80% в зависимости от субпопуляции) блокаде фосфорилирования ERK1/2 как в цитоплазме, так и ядре изученных типов ГСК (таблица 2). Это свидетельствует о том, что активация ERK1/2 в большей части зависит MEK1/2, но регулируется другим(ими) сигнальным(ыми) белком(ами). Наиболее вероятными кандидатами являются Ca²⁺/кальмодулин-зависимые протеинкиназы (CaMK), поскольку они способны напрямую фосфорилировать ERK1/2 в процессе передачи регуляторно-модифицирующего сигнала [37, 38]. При этом АФП-индуцированная активация CaMKII и CaMKIV была выявлена в цитоплазме изученных типов ГСК [27, 39]. С другой стороны, на данный процесс потенциально может влиять и рецептор-зависимый эндоцитозный путь [40], который был выявлен в CD34⁺CD135⁺ и CD34⁺CD117⁺ ГСК [41].

Изучение активации выявленных ERK1/2-зависимых киназ в присутствии ингибитора ERK (ERKInh) показало, что ERK1/2 являлась основным и единственным индуктором MNK1/2 в CD34⁺CD133⁺ и CD34⁺CD135⁺ ГСК, MSK1/2 в CD34⁺CD133⁺ ГСК и RSK1/2/3/4 в CD34⁺CD135⁺ ГСК, а также принимала частичное (на ~70% в CD34⁺CD133⁺ ГСК и на ~55% в CD34⁺CD133⁺ ГСК) участие в фосфорилировании киназы p70S6K в CD34⁺CD133⁺ и CD34⁺CD135⁺ ГСК (таблица 3).



Таблица 1

Уровень фосфорилированной формы MEK1/2 в субпопуляциях АФП-индуцированных ГСК костного мозга в присутствии ингибитора V-Raf

Субпопуляции ГСК	Индукторы	MEK1/2, Ед/мл
CD34+CD133+	НК	10,6±1,8
	АФП	42,5±4,1
	Ингибитор VAY43-9006+АФП	6,4±2,3*
CD34+CD135+	НК	8,3±1,0
	АФП	38,4±3,7
	Ингибитор VAY43-9006+АФП	4,1±1,1*
CD34+CD117+	НК	11,5±2,1
	АФП	29,4±3,5
	Ингибитор VAY43-9006+АФП	8,9±1,7*

Примечания: НК – негативный контроль; «» - достоверность результатов в сравнении с эффектом АФП в отсутствии ингибитора P<0,05.*

Таблица 2

Уровень фосфорилированной формы ERK1/2 в субпопуляциях АФП-индуцированных ГСК костного мозга в присутствии ингибитора MEK

Субпопуляции ГСК	Индукторы	ERK1/2, Ед/мл	
		цитоплазма	ядро
CD34+CD133+	НК	12,1±2,4	0,3±0,3
	АФП	42,5±3,7	13,7±1,7
	Ингибитор SL 327+АФП	18,2±1,2*	2,74±0,6*
CD34+CD135+	НК	8,6±1,0	0,2±0,2
	АФП	41,8±3,5	12,3±2,1
	Ингибитор SL 327+АФП	24,2±2,9*	5,8±0,9*
CD34+CD117+	НК	10,5±2,1	0,4±0,5
	АФП	30,5±3,8	8,1±1,0
	Ингибитор SL 327+АФП	19,3±1,8*	3,6±0,5*

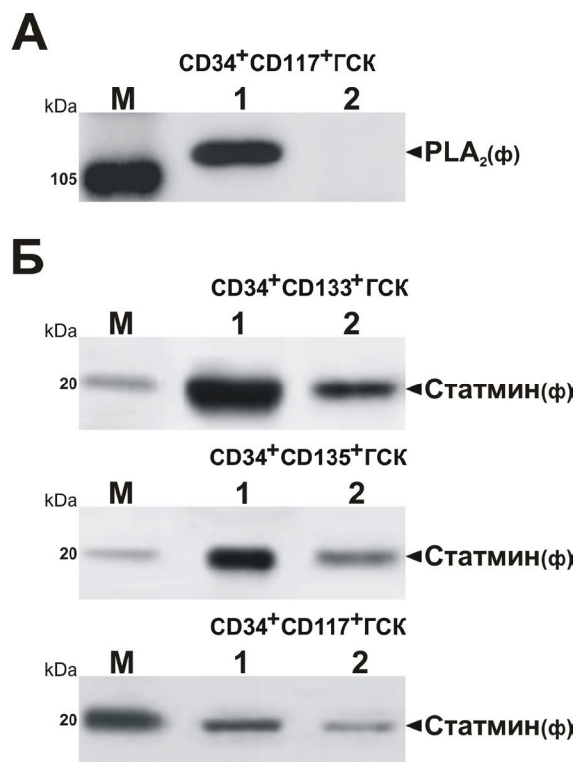
Примечания: НК – негативный контроль; «» - достоверность результатов в сравнении с эффектом АФП в отсутствии ингибитора P<0,05.*

Таблица 3

Уровень фосфорилированных форм MSK1/2 и MNK1/2, а также активности RSK1/2/3/4 и p70S6K киназ в субпопуляциях АФП-индуцированных ГСК костного мозга в присутствии ингибитора ERK

Субпопуляции ГСК	Индукторы	MNK1/2, Ед/мл	MSK1/2, Ед/мл	RSK1/2/3/4, пМ/мин/мкг		p70S6K, пМ/мин/мкг
				цитоплазма	ядро	
CD34+CD133+	НК	9,7±2,8	0,7±0,2	-	-	-
	АФП	20,7±2,4	32,3±4,1	-	-	12,4±2,1
	Ингибитор ERKInh+АФП	1,7±0,8*	0,5±0,3*			3,7±0,5*
CD34+CD135+	НК	5,7±1,2	-	0,9±0,3	0,7±0,2	-
	АФП	19,1±2,3	-	34,7±2,5	21,2±2,7	23,5±3,1
	Ингибитор ERKInh+АФП	0,9±0,4*		0,2±0,3*	0,5±0,4*	10,6±1,8*

Примечания: НК – негативный контроль; «» - достоверность результатов в сравнении с эффектом АФП в отсутствии ингибитора P<0,05.*



Обозначения: А – активация PLA₂ в CD34⁺CD117⁺ ГСК; Б – активация Статмина в ГСК; линия М – белковые маркеры; линия 1 – клетки, инкубированные с АФП в течение 240 мин; линия 2 – АФП-индуцированные клетки (240 мин), преинкубированные с ERK1Inh (6 ч); (φ) – фосфорилированная форма.

Рис. 1. Активация PLA₂ и Статмина в субпопуляциях АФП-индуцированных ГСК костного мозга в присутствии ингибитора ERK

Это свидетельствует о том, что активация p70S6K отчасти зависит от другого(их) сигнального(ых) белка(ов). На активность последней могут оказывать влияние другие сигнальные пути, такие как mTOR каскад, Akt каскад, PI3K каскад, p38 MAPK и JNK MAPK каскады и PKA каскад [28, 42-44]. Однако, наиболее вероятно, что дополнительным индуктором p70S6K является PKA, так как его ингибирование приводило к частичному подавлению активности p70S6K в цитоплазме CD34⁺CD133⁺ и CD34⁺CD135⁺ ГСК [25]. Исследование активации выявленных ERK1/2-зависимых регуляторных факторов показало, что преинкубация субпопуляций ГСК с ингибитором ERK1Inh обусловила полное подавление фосфорилирования PLA₂ и частичное подавление

процесса активации Статмина (рис. 1). Это позволяет констатировать, что активность последнего опосредуется другой(ими) сигнальной(ыми) молекулой(ами), например, CaMKII [45], CaMKIV [46], cdc2K [47], NO-зависимыми киназами [48], p38 MAPK и JNK [28, 29]. Хотя влияние CaMKII или CaMKIV на фосфорилирование Статмина наиболее вероятно, поскольку активированные формы обеих молекул были выявлены в цитоплазме изученных субпопуляций ГСК под воздействием АФП [27, 39]. Анализ активации выявленных ERK1/2-зависимых транскрипционных факторов, в присутствии ингибитора ERK1Inh, продемонстрировал, что Stat3, Sap1/2, Elk-1, c-Fos, c-Jun и Egr-1 в нуклеоплазме соответствующих типов ГСК были прямыми мишенями ERK1/2, которая являлась их единственным индуктором (таблица 4 и рис. 2А и 2Б). Аналогичная ситуация наблюдалась и при изучении активации в нуклеоплазме факторов биогенеза рибосом BRF1 и UBF (рис. 2В и 2Г).

Исследование мишеней MNK1/2 в CD34⁺CD133⁺ и CD34⁺CD135⁺ ГСК в присутствии ингибитора MNK (CGP57380) показало, что она являлась единственным индуктором трансляционного фактора eIF4E в цитоплазме (рис. 3).

Использование ингибитора MSK (ML-9) привело к полному подавлению фосфорилирования гистона H3 в нуклеоплазме CD34⁺CD133⁺ ГСК, в то время как активация выявленных транскрипционных факторов ATF-1 и CREB блокировалась частично, примерно на 80 и 20% соответственно (рис. 4). Исходя из этого, можно заключить, что АФП, при взаимодействии с CD34⁺CD133⁺ ГСК, индуцирует активацию других регуляторных молекул, помимо MSK1/2, которые задействованы в активации данных транскрипционных факторов. Наиболее вероятным кандидатом в случае ATF-1 является PKA, поскольку его ингибирование сопровождалось супрессией фосфорилирования ATF-1 в нуклеоплазме АФП-индуцированных CD34⁺CD133⁺ ГСК [25]. Что касается CREB, то его активация в нуклеоплазме АФП-индуцированных



CD34⁺CD133⁺ ГСК подавлялась как в случае использования ингибитора РКА, так и в случае использования ингибитора СаMKIV

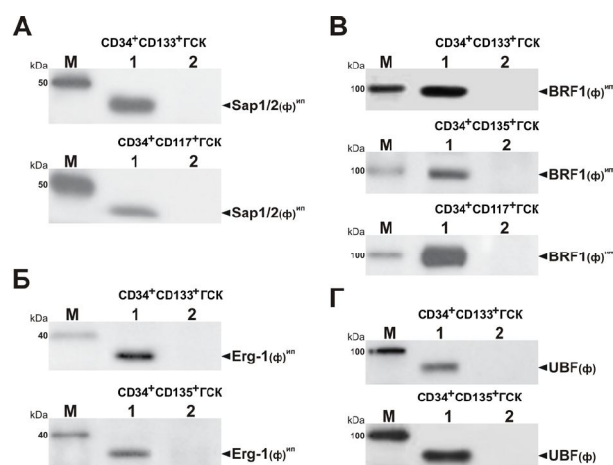
[25, 39], что позволяет предположить участие данных молекул в процессе фосфорилирования CREB.

Таблица 4

Содержание активной формы Stat3, Elk1, c-Fos и c-Jun в субпопуляциях АФП-индуцированных ГСК костного мозга в присутствии ингибитора ERK

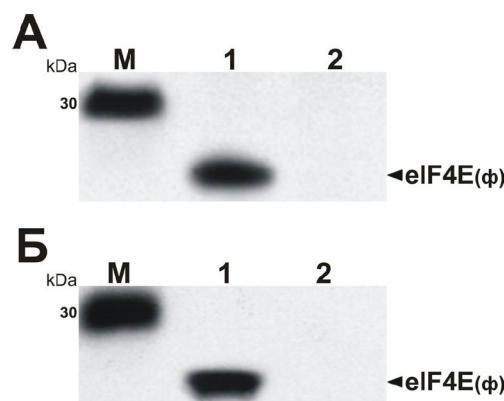
Субпопуляции ГСК	Индукторы	Stat3, пг/мл	Elk1, пг/мл	c-Fos, пг/мл	c-Jun, пг/мл
CD34 ⁺ CD133 ⁺	НК	0,2±0,1	-	-	-
	АФП	16,6±2,1	-	-	9,5±1,0
	Ингибитор ERKInh+АФП	0,3±0,2*	-	-	0,3±0,2*
CD34 ⁺ CD135 ⁺	НК	-	-	-	-
	АФП	7,1±1,1	23,8±2,7	14,2±2,0	19,2±2,1
	Ингибитор ERKInh+АФП	0,1±0,1*	0,4±0,2*	0,3±0,2*	0,2±0,1*
CD34 ⁺ CD117 ⁺	НК	0,3±0,2	-	-	0,9±0,2
	АФП	11,8±1,7	-	29,4±2,2	16,1±1,8
	Ингибитор ERKInh+АФП	0,2±0,2*	-	0,4±0,2*	0,4±0,3*

Примечания: НК – негативный контроль; «*» - достоверность результатов в сравнении с эффектом АФП в отсутствии ингибитора P<0,05.



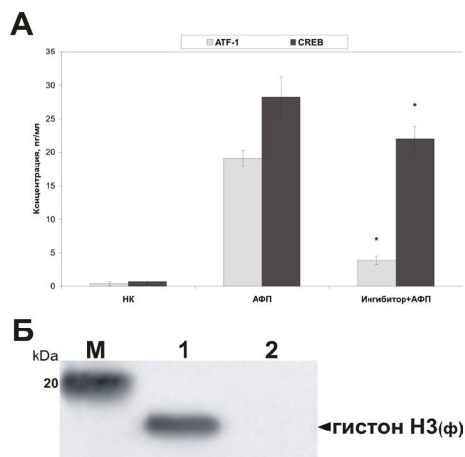
Обозначения: А – активация Sap1/2 в CD34⁺CD133⁺ и CD34⁺CD117⁺ ГСК; Б – активация Erg-1 в CD34⁺CD133⁺ и CD34⁺CD135⁺ ГСК; В – активация BRF1 в ГСК; Г – активация UBF CD34⁺CD133⁺ и CD34⁺CD135⁺ ГСК; линия М – белковые маркеры; линия 1 – клетки, инкубированные с АФП в течение 240 мин; линия 2 – АФП-индуцированные клетки (240 мин), преинкубированные с ERKInh (6 ч); (ф) – фосфорилированная форма.

Рис. 2. Активация Sap1/2, Erg-1, BRF1 и UBF в субпопуляциях АФП-индуцированных ГСК костного мозга в присутствии ингибитора ERK



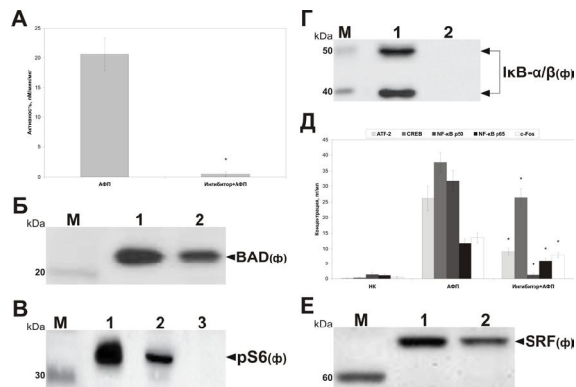
Обозначения: А – активация eIF4E в CD34⁺CD133⁺ ГСК; Б – активация eIF4E в CD34⁺CD135⁺ ГСК; линия М – белковые маркеры; линия 1 – клетки, инкубированные с АФП в течение 240 мин; линия 2 – АФП-индуцированные клетки (240 мин), преинкубированные с CGP57380 (6 ч); (ф) – фосфорилированная форма.

Рис. 3. Активация MNK1/2-зависимых молекул в субпопуляциях АФП-индуцированных ГСК костного мозга в присутствии ингибитора MNK



Обозначения: А – содержание фосфорилированных форм ATF-1 и CREB; Б – активация гистона H3; НК – негативный контроль; «*» – достоверность результатов в сравнении с эффектом АФП в отсутствии ингибитора $P < 0,05$; линия М – белковые маркеры; линия 1 – клетки, инкубированные с АФП в течение 240 мин; линия 2 – АФП-индуцированные клетки (240 мин), преинкубированные с ML-9 (6 ч); (ф) – фосфорилированная форма.

Рис. 4. Активация MSK1/2-зависимых молекул в субпопуляции АФП-индуцированных $CD34^+CD133^+$ ГСК костного мозга в присутствии ингибитора MSK



Обозначения: А – активность IKKα/β; Б – активация BAD; В – активация pS6; Г – активация IκB-α/β; Д – содержание активных форм транскрипционных факторов; Е – активация SRF; «*» – достоверность результатов в сравнении с эффектом АФП в отсутствии ингибитора $P < 0,05$; Линия М – белковые маркеры; линия 1 – клетки, инкубированные с АФП в течение 240 мин; линия 2 – АФП-индуцированные клетки (240 мин), преинкубированные с ингибитором SL0101 (6 ч); линия 2 – АФП-индуцированные клетки (240 мин), преинкубированные с SL0101 и SL-2052 (6 ч); (ф) – фосфорилированная форма.

Рис. 5. Активация RSK1/2/3/4-зависимых молекул в субпопуляции АФП-индуцированных $CD34^+CD135^+$ ГСК костного мозга в присутствии ингибитора RSK

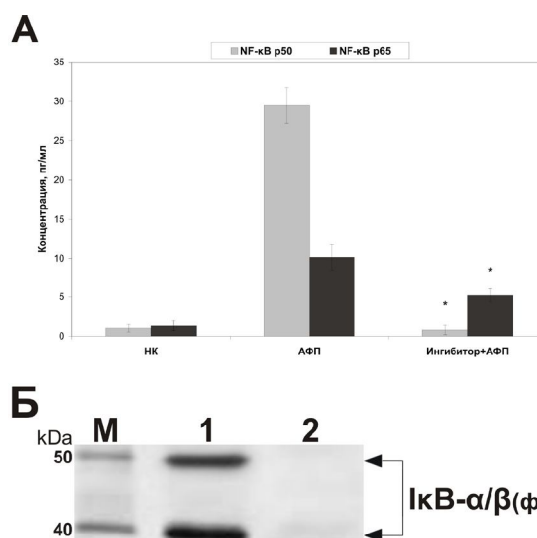
Анализ активации выявленных RSK1/2/3/4-зависимых сигнальных молекул в цитоплазме $CD34^+CD135^+$ ГСК, после их преинкубации с ингибитором RSK (SL0101), показал полное подавление фосфорилирования киназы IKKα/β и регуляторного фактора IκB-α/β, тогда как фосфорилирование BAD и pS6 было лишь частично ингибировано (рис. 5). Следовательно, в фосфорилировании данных сигнальных молекул принимают участие другие сигнальные молекулы, активируемые в ответ на АФП-индукцию. Так, в фосфорилировании pS6 участвует p70S6K, поскольку совместное использование ингибитора SL0101 и ингибитора p70S6K (SL-2052) приводило к 100% подавлению АФП-индуцированной активации pS6 (рис. 5B). В случае с BAD, вторым индуктором, по всей видимости, является PKA, ингибирование которой сопровождалось частичным подавлением фосфорилирования BAD в цитоплазме $CD34^+CD135^+$ ГСК [25]. Преинкубация $CD34^+CD135^+$ ГСК с ингибитором SL0101 показала, что RSK1/2/3/4 принимала участие в активации ряда транскрипционных факторов, но степень этого участия была различной (рис. 5Д и 5Е). Так, наблюдалось полное подавление активации NF-κB p50 и частичное подавление фосфорилирования SRF, а также ATF-2 (на ~65%), CREB (на ~30%) и NF-κB p65 (на ~50%). Это позволяет говорить о том, что в регуляции активности данных молекул принимают участие какие-то дополнительные сигнальные молекулы, активирующиеся при АФП-индукции $CD34^+CD135^+$ ГСК и мигрирующие в ядро. Такими молекулами могут являться CaMKII (в случае с SRF) и PKA (в случае с CREB и NF-κB p65), ингибирование которых характеризовалось супрессией активации изучаемых транскрипционных факторов в нуклеоплазме АФП-индуцированных $CD34^+CD135^+$ ГСК [25, 39]. Кроме того, использование ингибитора SL0101 также привело к подавлению фосфорилирования фактора c-Fos (рис. 5Д), что говорит о его RSK1/2/3/4-опосредованной активации, на-



ряду с прямым эффектом ERK1/2. Необходимо отметить, что RSK1/2/3/4, вероятнее всего, не оказывает прямого влияния на активацию NF-κB p50 и NF-κB p65, так как преинкубация CD34⁺CD135⁺ ГСК с ингибитором RSK1/2/3/4-зависимой киназы IKKα/β (IKK16) приводила к аналогичному с эффектом ингибитора SL0101 подавлению фосфорилирования обоих транскрипционных факторов (рис. 6А). Более того, использование ингибитора IKK16 сопровождалось полной блокадой фосфорилирования белка IκB-α/β (рис. 6Б), что говорит о его зависимости от IKKα/β. В свою очередь белок IκB-α/β является основным естественным ингибитором активации факторов NF-κB p50 и NF-κB p65, а фосфорилирование приводит его к дезактивации [49, 50]. Поэтому RSK1/2/3/4 оказывает влияние на NF-κB p50 и NF-κB p65 через IKKα/β-опосредованное фосфорилирование IκB-α/β, ведущее к высвобождению активированных форм транскрипционных факторов.

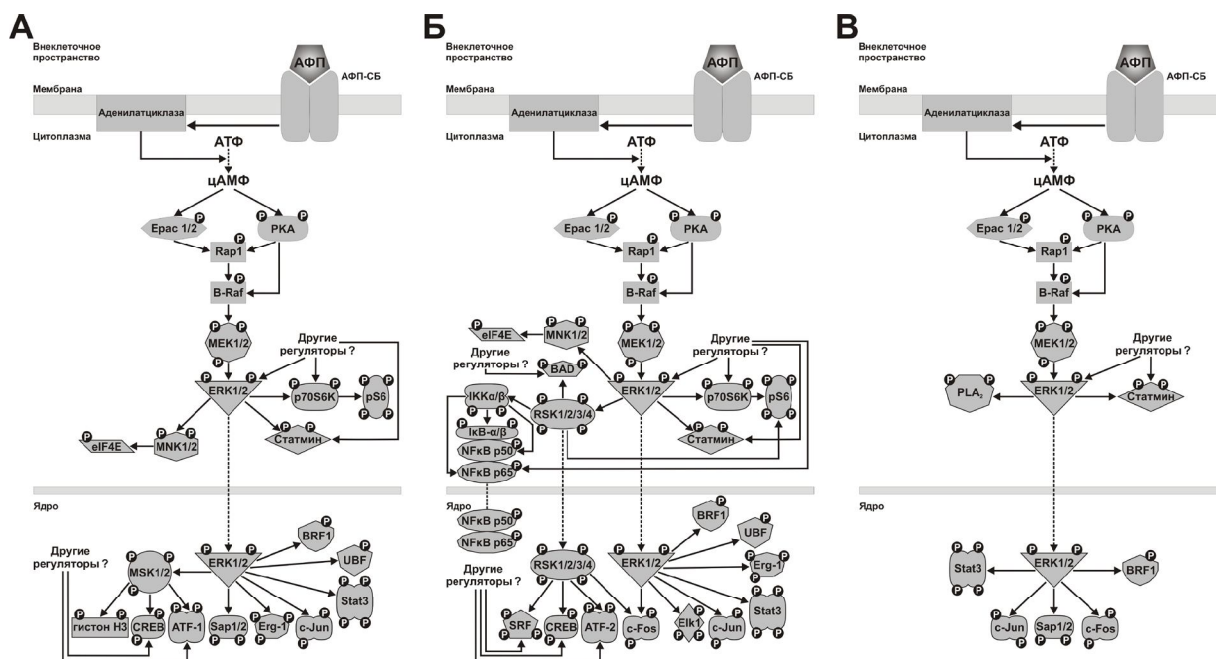
Таким образом изучение взаимодействия выявленных сигнальных элементов MAPK каскадов доказало, что в изученных типах ГСК костного мозга под воздействием АФП активируется ERK1/2 сигнальный каскад (рис. 7). Важно отметить, что во всех субпопуляциях ГСК существуют какие-то другие сигнальные пути, влияющие на активацию самой ERK1/2 в цитоплазме и ее транслокацию в ядро, на фосфорилирование киназы p70S6K, регуляторного белка VAD и Статина в цитоплазме, а также транскрипционных факторов ATF-1, ATF-2, CREB, NF-κB p65 и SRF в нуклеоплазме (рис. 7). Наиболее вероятными кандидатами

являются цАМФ/РКА каскад и Ca²⁺/кальмодулин/СаМК каскады, которые функционируют в изученных субпопуляциях ГСК костного мозга под воздействием АФП в условиях *in vitro* и которые вносят свой вклад в активацию указанных сигнальных молекул ERK1/2 сигнального каскада. Поэтому необходимо изучение взаимосвязи выявленного MAPK пути с выявленными Ca²⁺-зависимыми и цАМФ-зависимыми каскадами. В дополнение к этому, необходимо определить вклад выявленного ERK1/2 каскада в ответную реакцию ГСК на воздействие АФП.



Обозначение: А – содержание активных форм транскрипционных факторов; Б – фтизация IκB-α/β; «*» - достоверность результатов в сравнении с эффектом АФП в отсутствии ингибитора IKK16 P<0,05.

Рис. 6. Активация транскрипционных факторов NF-κB в субпопуляции АФП-индуцированных CD34⁺CD135⁺ ГСК костного мозга в присутствии ингибитора IKKα/β



Обозначения: А – структурная схема ERK1/2-зависимого сигнального пути в CD34⁺CD133⁺ ГСК; Б – структурная схема ERK1/2-зависимого сигнального пути в CD34⁺CD135⁺ ГСК; В – структурная схема ERK1/2-зависимого сигнального пути в CD34⁺CD117⁺ ГСК; → – прямая активация; - - → – транслокация; P – остаток фосфорной кислоты.

Рис. 7. Структурная схема АФП-активируемых ERK1/2-зависимого сигнального пути в субпопуляциях ГСК костного мозга

Литература

1. Абелев Г.И. Альфа-фетопроtein: биология, биохимия и молекулярная генетика // Иммунология. - 1994. - №3. - С. 3-10.
2. Abelev G.I. Alpha-fetoprotein biology // Vestn. Ross. Akad. Med. Nauk. - 2001. - Vol. 9. - P. 77-89.
3. Mizejewski G.I. The filogeny of alpha-fetoprotein in vertebrates: survey of biochemical and physiological data // Crit. Rev. Eucar. Gene Exp. - 1995. - Vol. 5. - P. 281-316.
4. Deutsch H.F. Chemistry and biology of alpha-fetoprotein // Adv. Cancer Res. - 1991. - Vol. 56. - P. 253-312.
5. Mizejewski G.J. Biological roles of alpha-fetoprotein during pregnancy and perinatal development // Exp. Biol. Med. - 2004. - Vol. 229. - P. 439-463.
6. Trojan J. and 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.
7. Uriel J., Trojan J., Moro R., Pineiro A. Intracellular uptake of alpha-fetoprotein: a marker of neural differentiation // Ann. N.Y. Acad. Sci. - 1983. - Vol. 417. - P. 321-329.
8. Geuskens M., Naval J., Uriel J. Ultrastructural studies of the intracellular translocation of endocytosed alpha-foetoprotein (AFP) by cytochemistry and of the uptake of 3H-arachidonic acid bound to AFP by autoradiography in rat rhabdomyosarcoma cells // J. Cell. Physiol. - 1986. - Vol. 128. - P. 389-396.
9. Brock D.G.H. and Bolton A.T. Prenatal diagnosis of anencephaly through maternal serum alpha-fetoprotein // Ibid. - 1973. - Vol. 2. - P. 923-924.
10. Aitken D.A. and Crossley J.A. Neural tube defects/alpha-fetoprotein screening // Curr. Opin. Obstet. Gynecol. - 1997. - Vol. 9. - P. 113-120.
11. Dziadek M. and Adamson E. Localisation and synthesis of alpha-fetoprotein in postimplantation mouse embryos // J. Embriol. Exp. Morphol. - 1978. - Vol. 43. - P. 289-313.



12. 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.
13. Moro R. and Uriel J. Early localization of alpha-fetoprotein in the developing nervous system of the chicken // *Oncodev. Biol. Med.* - 1981. - Vol. 2. - P. 391-398.
14. Lorenzo H.C., Geuskens M., Macho A., Lachkar S., Verdiere-Sahuque M., Pineiro A., Uriel J. Alpha-fetoprotein binding and uptake by primary cultures of human skeletal muscle // *Tumor Biol.* - 1996. - Vol. 17. - P. 251-260.
15. 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.
16. Toran-Allerand C.D. Coexistence of alpha-fetoprotein, albumin and transferrin immunoreactivity in neurones of the developing mouse brain // *Nature.* - 1980. - Vol. 286. - P. 733-735.
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., Tateishe 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-фетопротейном: молекулярная организация путей сигнальной трансдукции: Автореф. ... канд. биол. наук. - Алматы, 2010. - 22с.
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-фетопротейна 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-фетопротейном // *Биотех. Теор. Практ.* - 2008. - №1. - С. 50-68.
27. Рыбакова Е.В., Кулманов М.Е., Богданов А.Ю. Активация Ca²⁺- и цАМФ-зависимых сигнальных путей передачи сигнала в гемопоэтических стволовых клетках костного мозга АФП-инъецированных 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. Практ.* – 2004. – № 3. - С. 83-89.
36. Rosenberg I.M. *Protein analysis and Purification.* – Boston: Birkhäuser. 1996. - 434p.
37. Clapham DE. Calcium signaling // *Cell.* – 1995. – Vol. 80. - P. 259-268.
38. Corcoran E.E. and Means A.R. Defining Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase cascades in transcriptional regulation // *J. Biol. Chem.* – 2001. – Vol. 276. - P. 2975-2978.
39. Богданова Т.М., Рыбакова Е.В., Фомичева Е.В., Калыкова А.С., Бедарева Т.Е., Беляев Н.Н., Богданов А.Ю. Структура Ca²⁺-зависимых сигнальных путей, вовлеченных в передачу регуляторного сигнала альфа-фетопротеина в гемопоэтических стволовых клетках костного мозга // *Здор. и Болез.* - 2008. - №6. - С.121-138.
40. von Zastrow M., Sorkin A. Signaling on the endocytic pathway // *Cur. Opin. Cell Biol.* – 2007. - Vol. 19. - P. 436-445.
41. Bogdanov A.Y., Rybakova T.M., Belyaev N.N. Receptor-mediated endocytosis of alpha-fetoprotein in hematopoietic stem cells: molecular compounds and stages of endocytic pathway // *Abstracts-book of 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology.* – 2006. - P. 117.
42. Aoki M., Blazek E., Vogt P.K. A role of the kinase mTOR in cellular transformation induced by the oncoproteins P3K and Akt // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2001. – Vol. 98. - P. 136-141.
43. Feng L.X., Ravindranath N., Dym M. Stem cell factor/c-kit up-regulates cyclin D3 and promotes cell cycle progression via the phosphoinositide 3-kinase/p70S6 kinase pathway in spermatogonia // *J. Biol. Chem.* – 2000. - Vol. 275. - P. 25572-25576.
44. Roger P.P., Reuse S., Maenhaut C., Dumont J.E. Multiple facets of the modulation of growth by cAMP // *Vitam. Horm.* - 1995. – Vol. 51. - P. 159-191.
45. Marklund U., Larsson N., Brattsand G., Osterman O., Chatila T.A., Gullberg M. Serine 16 of oncoprotein 18 is a major cytosolic target for the Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase-Gr // *Eur. J. Biochem.* – 1994. – Vol. 225. - P. 53-60.
46. le Gouvello S., Manceau V., Sobel A. Serine 16 of stathmin as a cytosolic target for Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II after CD2 triggering of human T lymphocytes // *J. Immunol.* – 1998. – Vol. 161. - P. 1113-1122.
47. Luo X.N., Mookerjee B., Ferrari A., Mistry S., Atweh G.F. Regulation of phosphoprotein p18 in leukemic cells. Cell cycle regulated phosphorylation by p34cdc2 kinase // *J. Biol. Chem.* – 1994. – Vol. 269. - P. 10312-10318.
48. Schndler H., Bogdan C. NO as a signaling molecule: effects on kinases // *Int. Immunopharm.* – 2001. – Vol. 1, - P. 1443-1455.
49. May M.J., Ghosh S. Signal transduction through NF-κB // *Immun. Today.* – 1998. – Vol. 19. - P. 80-88.
50. Perkins N.D. Integrating cell-signalling pathways with NF-κB 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 каскадтарындағы анықталған ERK1/2 типті сигналдық молекулаларының өзара әсерлесуі зерттелді. Нәтижесінде АФП индукцияландырылған ERK1/2 фосфорлануы MEK1/2 байланысты B-Raf активациясына үлкен дәрежеде тәуелді екені көрсетілді. Өз кезегінде, ERK1/2 CD34⁺CD133⁺ және CD34⁺CD135⁺ ГБЖ MNK1/2, CD34⁺CD133⁺ ГБЖ MSK1/2, CD34⁺CD135⁺ ГБЖ RSK1/2/3/4 және CD34⁺CD117⁺ ГБЖ PLA₂ жалғыз индукторы болып табылды.



Осыған кереғар Статминнің және p70S6K активациясы ГБЖ барлық субпопуляцияларында ERK1/2 жартылай тәуелді болды. Нуклеоплазманың реттеуші факторларының анализі Stat3, Sap1/2, c-Fos, c-Jun, Erg-1, сол сияқты BRF1 және UBF фосфорлануы толығымен ERK1/2 байланыстылығын көрсетті. ERK1/2-тәуелді киназалардың нысаналарын зерттеу MNK1/2 eIF4E бірегей индукторы екенін, өз кезегінде MSK1/2 ингибирлеу тек H3 гистонының фосфорлануын толық, ал ATF-1 және CREB активациясы жартылай тежейтінін көрсетті. RSK1/2/3/4 ингибирлеу IKK α/β және соған сәйкес өзіне тәуелді NF- κ B p50 толық тежелуіне әкелді. BAD, NF- κ B p50, CREB, SRF және ATF-2 фосфорлануында RSK1/2/3/4 қатысы толық болмады. Осындай жағдай екінші индукторы ERK1/2 және p70S6K болып табылатын c-Fos және pS6 қатысты үрдістерде де байқалды. Аталған барлық мәліметтер сүйек кемігінің үш типті ГБЖ АФП әсерінен ERK1/2 белгі беру каскады қызмет ететінін негіздеп көрсетуге мүмкіндік береді.

Summary

In the present work an interaction of detected ERK1/2 signal molecules of MARK cascade type in HSCs of bone marrow was studied by example of CD34⁺CD133⁺, CD34⁺CD135⁺ and CD34⁺CD133⁺ HSCs in the course of their AFP-stimulus *in vitro*. As a result it was demonstrated that AFP-induced phosphorylation of ERK1/2 mostly but not completely depended on MEK1/2-mediated activation of B-Raf. In turn, ERK1/2 was a single inductor of MNK1/2 in CD34⁺CD133⁺ HSCs and CD34⁺CD135⁺ HSCs, MSK1/2 in CD34⁺CD133⁺ HSCs, RSK1/2/3/4 in CD34⁺CD135⁺ HSCs, and PLA₂ in CD34⁺CD117⁺ HSCs. On the contrary, activation of Stathmin and p70S6K was in part dependent on ERK1/2 in every HSCs subpopulation under the study. Analysis of phosphorylation regulatory factors in nucleoplasm revealed that Stat3, Sap1/2, Elk-1, c-Fos, c-Jun, and Erg-1, as well as BRF1 and UBF were completely ERK1/2-mediated. Investigation of ERK1/2-dependent kinase targets showed that MNK1/2 was a single eIF4E inductor, while MSK1/2 inhibition resulted in total phosphorylation suppression of histone H3, at that activation of ATF-1 and CREB was inhibited in part. Inhibition of RSK1/2/3/4 resulted in total phosphorylation suppression of IKK α/β only and, accordingly, dependent activation of NF- κ B p50. As concerns BAD, NF- κ B p65, CREB, SRF, and ATF-2, RSK1/2/3/4 participated in their phosphorylation partly. The similar situation was observed with c-Fos и pS6, as in this process ERK1/2 and p70S6K were the second inductors. The findings enable to conclude that in three distinct HSCs subpopulations in bone marrow under AFP influence ERK1/2 signal cascade is functioning.