

ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ ИНГИБИТОРЫ Р13-КИНАЗЫ ВОРТМАННИН И LY294002 ОКАЗЫВАЮТ РАЗЛИЧНОЕ ВЛИЯНИЕ НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК МЫШИ

© М. С. Лянгузова,^{1,*} И. А. Чуйкин,¹ А. Нордхайм,² В. А. Поспелов¹

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия, и ² Университет г. Тюбинген, Германия;
* электронный адрес: lianguzova@gmail.com

Пролиферация эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) мышцы происходит независимо от присутствия ростовых факторов в среде культивирования. Возможно, роль внутреннего митогенного сигнала, который обуславливает автономность пролиферации ЭСК, исполняет постоянно активный каскад, зависящий от Р13-киназы. В настоящей работе исследовали вклад этого сигнального пути в регуляцию пролиферации ЭСК мышцы, используя два ингибитора Р13-киназы — вортманнин и LY294002. Показано, что вортманнин менее эффективно по сравнению с LY294002 подавляет фосфорилирование белка РКВ, который является мишенью Р13К-зависимого каскада, а также не оказывает ингибирующего влияния на пролиферацию ЭСК, в то время как LY294002 вызывает существенное снижение доли клеток в фазе S и накопление клеток в фазе G₁. Содержание циклина E и циклин E-ассоциированная киназная активность снижены в клетках, обработанных LY294002, но не изменяются в клетках, обработанных вортманнином. Однако количество циклина D1 в ЭСК существенно снижается в результате обработки их как LY294002, так и вортманнином. Выявлено, что в ЭСК мышцы подавление активности Р13-киназы и остановка в фазе G₁ не сопровождаются увеличением транскрипции гена *p27^{kip1}* и накоплением ингибитора циклин-киназных комплексов *p27^{kip1}*. Как LY294002, так и вортманнин вызывают апоптоз в ЭСК мышцы и подавляют рост популяции. Таким образом, инактивация Р13-киназы в ЭСК мышцы приводит скорее к гибели, чем к блоку клеточного цикла.

Ключевые слова: эмбриональные стволовые клетки мышцы, пролиферация, Р13-киназа, вортманнин, LY294002.

Принятые сокращения: ПААГ — полиакриламидный гель, ПЦР — полимеразная цепная реакция, ЭСК — эмбриональные стволовые клетки, Cdk — циклинзависимая киназа, CK2 — казеин-киназа 2, FCS — эмбриональная сыворотка крупного рогатого скота, GSK3 — киназа-3 гликоген-синтазы, LIF — фактор, ингибирующий рост лейкемии, MEK — митогенактивируемая киназа киназы 1, PBS — фосфатно-солевой буфер, Р13К — фосфатидилинозитол-3-киназа, РКВ — протеинкиназа В.

Эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) мышцы пролиферируют с высокой скоростью и не способны реализовать блок клеточного цикла в отсутствие экзогенных ростовых факторов или при повреждении ДНК (Schratt et al., 2001; Малашичева и др., 2002). Молекулярные механизмы, обуславливающие автономность пролиферации ЭСК, пока еще мало изучены. Вероятно, сигнальные каскады, необходимые для перехода клеток из фазы G₁ в фазу S клеточного цикла, в ЭСК мышцы не нуждаются в стимуляции экзогенными факторами, в результате чего ЭСК постоянно коммитированы к пролиферации. Какие именно сигнальные пути инициируют начало фазы синтеза ДНК в ЭСК мышцы, сегодня остается неизвестным. Одним из возможных активаторов перехода G₁ → S в ЭСК является сигнальный каскад, зависящий от фосфатидилинозитол-3-киназы (Р13-киназы). Известно, что в ЭСК Р13-киназа конститутивно активирована белком ERas — гомологом протоонкогена Ras, экспрессия которого имеет место только в недифференцированных ЭСК (Takahashi et al., 2003). Исследования, проведенные на культуре эмбриональных фибробластов грызунов, пока-

зали, что активация Р13-киназы необходима для завершения клеткой фазы G₁ и начала фазы синтеза ДНК (Jones, Kazaukas, 2001). Ингибиторы Р13-киназы вызывают в фибробластах остановку клеточного цикла в фазе G₁, которая сопровождается накоплением белка *p27^{kip1}* — ингибитора циклин-киназных комплексов — и снижением количества циклина D1 (Collado et al., 2000).

Мы исследовали участие Р13-киназы в регуляции пролиферации ЭСК мышцы с помощью двух ее ингибиторов — LY294002 и вортманнина (wortmannin). Оба ингибитора инактивируют Р13-киназу, занимая АТФ-связывающий карман каталитической субъединицы фермента. Однако известно, что вортманнин более специфично соединяется с АТФ-связывающим карманом каталитической субъединицы Р13-киназы, чем LY294002 и другие ингибиторы Р13-киназы (Walker et al., 2000). Кроме того, показано, что LY294002 в отличие от вортманнина может блокировать K⁺-каналы (El-Kholy et al., 2003). LY294002 и вортманнин инактивируют не только Р13-киназу, но и ряд других ферментов, причем спектры ингибируемых киназ у них разные (Davies et al., 2000).

Показано, что LY294002 способен подавить пролиферацию ЭСК мыши, вызывая блок клеточного цикла, гибель и снижение экспрессии маркеров плюрипотентных клеток при длительной обработке (Jirmanova et al., 2002; Paling et al., 2004; Gross et al., 2005). О влиянии вортманнина на ЭСК до сих пор ничего не сообщалось, в то время как его действие на фибробласты описано и совпадает с действием LY294002: оба ингибитора вызывают остановку клеточного цикла в фазе G₁, сопровождающуюся накоплением ингибитора циклин-киназных комплексов белка p27^{Kip1} (Collado et al., 2000).

В связи с этими литературными данными мы решили сравнить действие LY294002 и вортманнина на ЭСК мыши и выяснить с их помощью влияние инактивации Р13-киназы на пролиферацию ЭСК мыши.

ЭСК линий IOUD2 и E 14.1 культивировали в среде DMEM (Gibco BRL, США) с добавлением 10 % FCS (РАА, 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. Ингибиторы киназ — PD98059, росковитин, LY294002 и вортманнин (Calbiochem, Германия); ингибитор казеинкиназы 2 ТВВ любезно предоставлен проф. Л. Пинна (Университет г. Падова, Италия).

Для индукции дифференировки клетки рассеивали в среде, содержащей 1 мкМ ретиноевой кислоты (All-trans retinoic acid, Sigma, США), не содержащей LIF, и культивировали 3 сут. После этого клетки культивировали еще 1 сут в чистой среде.

Проточная цитофлуориметрия ДНК. Растущую в монослое культуру клеток снимали с чашек раствором Версена, центрифугировали 5 мин при 1000 g, суспендировали в 0.01%-ном растворе сапонина в PBS и инкубировали при комнатной температуре 30 мин. После этого пробы дважды промывали PBS, затем инкубировали в растворе РНКазы (100 мкг/мл) и иодистого пропиона (40 мкг/мл) 15 мин при 37 °С. Пробу подвергали анализу на содержание ДНК на проточном цитометре (Beckman Coulter, США).

Оценку жизнеспособности популяции производили колориметрическим методом с использованием метилтиазиолидифенилтетразолиум бромид (MTT) (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 ингибиторы Р13-киназы на 1 сут. После этого среду отбирали, к клеткам добавляли 0.5 мг/мл МТТ, растворенного в PBS, и инкубировали в течение 1 ч при 37 °С в атмосфере 7.5 % CO₂. Образовавшийся осадок формазана растворяли, добавляли в лунку равный объем 0.04 М HCl в изопропанол и тщательно пипетировали. Затем измеряли оптическую плотность образцов при длине волны 570 нм относительно чистого раствора МТТ с добавленным в него 0.04 М HCl в изопропанол. При построении графика за 100 % принимали показания контрольной популяции.

Вестерн-блоттинг. Для исследования содержания белков методом иммуноблоттинга клеточные экстракты

получали путем лизиса клеток 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 белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Amersham, Великобритания). В качестве первых антител использовали антитела к фосфорилированному по Ser-473 белку PKB (кат. № 9271), к расщепленной форме каспазы 3 (кат. № 9661; Cell signaling, США), к циклинам D1 (кат. № sc-717), A (кат. № sc-751) и E (кат. № sc-418), к ингибитору циклин-зависимых комплексов p27^{Kip1} (кат. № sc-1641; Santa Cruz, США), к GAPDH (кат. № 5G4; HyTest, 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 хемилюминесценции (ECL, Amersham, Великобритания).

Активности киназ, ассоциированных с циклином E, оценивали по реакции фосфорилирования гистона H1 in vitro. Клеточные лизаты получали, инкубируя клетки 45 мин на льду в лизирующем буфере (10 мМ Tris-HCl, pH 7.4, 150 мМ 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 Santa Cruz, кат. № sc-418 в течение 2—4 ч при 4 °С, затем полученные комплексы осаждали, ингибируя с протеин А-сефарозой 30—60 мин при 4 °С 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 дитиотрептола, 25 мкМ немеченого АТФ, 74 кБк [γ -³²P] АТФ и 1 мкг гистона H1. Реакцию проводили 20 мин при 30 °С и останавливали добавлением буфера Лэммли для нанесения проб. Пробу кипятили 5 мин, после электрофореза гель сушили и экспонировали с рентгеновской пленкой.

Обратная транскрипция и ПЦР. Тотальную клеточную РНК выделяли с помощью реагента Trizol® (Gibco BRL, США). Реакции обратной транскрипции (ОТ) и амплификации (ПЦР) проводили по протоколу, описанному ранее (Kukushkin et al., 2002). В реакциях амплификации использовали праймеры к следующим генам мыши: *gapdh* — 5'-TG TGATGGGTGTGAAC-CACG-3'/5'-CCAGTGAGCTTCCCGTTCAG-3'; *eras* — 5'-GCTGGCGTCTTGCTCTTG-3'/5'-AGCAGGGCAA-AGGCTTCCTC-3'; *pou5f1* — 5'-CTCGAACCTGGCTA-AGTTC-3'/5'-TTCATGCTCTGGACTCCCTC-3'; *p27* — 5'-ACTTGAGAGAAGCACTGCC-3'/5'-TTCCTCATCCC-TGGACAC-3'; *циклин D1* — 5'-TGTTCTGGCCTCTA-AGATG-3'/5'-TCTGGAAAGAAAGTGCCTTG-3'; *циклин E* — 5'-ACCCTCCAAAGTTGCACCAG-3'/5'-CCAT-CTCCCGGATAACCATG-3'.

Результаты

В популяции недифференцированных ЭСК мыши около 70 % клеток одновременно находится в фазе синтеза ДНК, доля клеток в фазе G₁ составляет меньше 20 % (рис. 1, а). Такое распределение по фазам клеточного

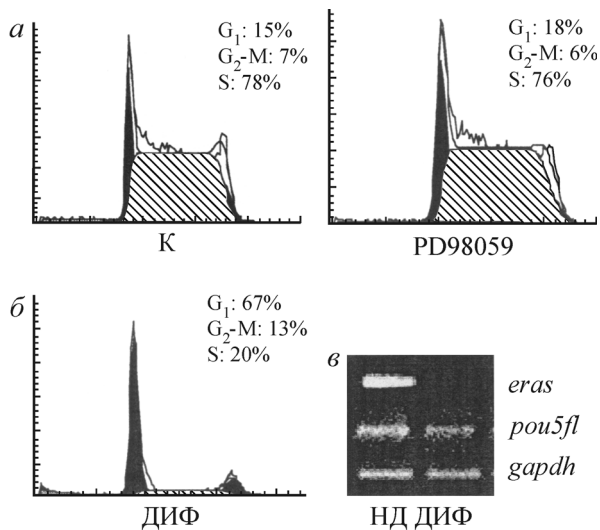


Рис. 1. Распределение по фазам клеточного цикла недифференцированных эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) мыши при инактивации MEK/Erk-сигнального пути (а), дифференцированных ЭСК (б) и экспрессия гена *eras* в ЭСК (в) до (НД) и после (ДИФ) дифференцировки.

а — через 17 ч обработки клеток ингибитором киназы MEK PD98059 (50 мкМ); К — контроль. б — ЭСК, дифференцированные в течение 4 сут; по оси абсцисс — содержание ДНК, отн. ед.; по оси ординат — количество клеток. в — экспрессия гена *eras* и гена-маркера недифференцированных клеток *pou5fl* в недифференцированных (НД) и дифференцированных в течение 4 сут (ДИФ) ЭСК; *gapdh* — в качестве контроля наугрузки. Метод ОТ-ПЦР.

цикла свидетельствует об очень быстрой пролиферации ЭСК. Классическим активатором событий клеточного цикла, в частности перехода G₁ → S, является MEK-Erk-зависимый каскад. Для того, чтобы выяснить вклад этого сигнального каскада в прохождение ЭСК мыши по клеточному циклу, мы проанализировали содержание ЭСК в разных фазах клеточного цикла через 17 ч обработки ингибитором киназы MEK PD98059. На рис. 1, а видно, что инактивация MEK/Erk-зависимого каскада не приводит к изменению пролиферации в ЭСК, содержание клеток в фазах G₁ и S одинаково в контрольных и обработанных PD98059 клетках. В результате дифференцировки, индуцированной ретиноевой кислотой, пролиферация ЭСК замедляется, клетки накапливаются в фазе G₁ (67 % по сравнению с 15 % в популяции недифференцированных клеток), доля клеток в фазе S снижается до 20 % (рис. 1, б). Эти изменения сопровождаются ослаблением транскрипции гена *pou5fl*, кодирующего маркерный для ЭСК транскрипционный фактор Oct-4, и полным снижением транскрипции гена *eras* (рис. 1, в). Известно, что продукт гена *eras* стимулирует рост ЭСК посредством активации каскада, зависящего от PI3-киназы (Takahashi et al., 2003).

Для того чтобы выяснить роль активности PI3-киназы в стимуляции прохождения ЭСК мыши по клеточному циклу, мы использовали ингибиторы PI3-киназы LY294002 и вортманнин. На рис. 2, а видно, что обработка ЭСК LY294002 подавляет переход G₁ → S в ЭСК мыши, что выражается в снижении доли клеток в фазе S и увеличении фазы G₁. Этот эффект LY294002 на пролиферацию ЭСК выражен сильнее, если клетки были обработаны ингибитором в бессывороточных условиях: доля клеток в фазе S снижается до 27 %, в фазе G₁ возрастает до 57 % (рис. 2, б). Обработка ЭСК вортманнином как в

нормальных, так и в бессывороточных условиях не влияет на их распределение по фазам клеточного цикла (рис. 2, а, б). Таким образом, вортманнин в отличие от LY294002 не препятствует переходу G₁ → S в ЭСК.

Для оценки жизнеспособности ЭСК, обработанных ингибиторами PI3-киназы, был применен МТТ-тест, выявляющий живые клетки по активности митохондриальных ферментов. Полученные данные представлены на рис. 2, в. Обработка ЭСК вортманнином приводит к некоторому снижению количества живых клеток в популяции, в то время как обработка LY294002 сокращает число живых клеток более чем в половину по сравнению с контрольной, не обработанной ингибиторами популяцией. Таким образом, жизнеспособность популяции ЭСК в результате обработки обоими ингибиторами PI3-киназы снижается, причем негативный эффект ингибиторов PI3-киназы проявляется как в нормальных, так и в бессывороточных условиях культивирования. Следует отметить, что сывороточное голодание само по себе приводит к сокращению численности популяции ЭСК.

Обработка ЭСК ингибиторами PI3-киназы приводит к накоплению активной формы каспазы 3, которое свидетельствует о процессе апоптотической гибели (рис. 2, з). LY294002 значительно сильнее, чем вортманнин, индуцирует накопление активной каспазы 3 в ЭСК. Действие ингибиторов хорошо заметно в клетках, обработанных ингибиторами PI3-киназы в нормальных условиях культивирования. Сывороточное голодание само по себе индуцирует апоптоз в ЭСК, на фоне этой гибели трудно судить об индукции апоптоза ингибиторами PI3-киназы.

Ключевым участником каскада, активируемого PI3-киназой, является протеинкиназа В (РКВ). Наличие фосфатных групп у РКВ на остатках тирозина 308 и серина 473 свидетельствует об активности PI3-киназы. С помощью вестерн-блотинга было показано, что в ЭСК, обработанных ингибиторами PI3-киназы как в нормальных условиях, так и в условиях сывороточного голодания, количество фосфорилированной по серину 473 формы РКВ снижено (рис. 2, д). Однако обработка ЭСК LY294002 приводит к более выраженному уменьшению количества фосфорилированной формы РКВ в клетках, чем обработка вортманнином (рис. 2, д).

Считается, что вортманнин менее стабилен в водной среде, чем LY294002. Чтобы избежать снижения количества активного вортманнина за счет его деградации, среду с вортманнином обновляли каждые 1.5 ч, используя при этом высокую концентрацию ингибитора (1 мкМ). Клетки культивировали в таких условиях 9 ч, что примерно составляет продолжительность клеточного цикла ЭСК и достаточно для детекции изменений в пролиферации. Последующий цитофлуориметрический анализ не выявил изменений в распределении клеток по фазам клеточного цикла (рис. 3, а). Таким образом, отсутствие влияния вортманнина на пролиферацию ЭСК не является следствием его деградации в водной среде. Известно, что LY294002 в отличие от вортманнина инактивирует не только PI3-киназу, но и CK2 (Davies et al., 2000). Обработка ЭСК ингибитором CK2 ТВВ (4,5,6,7-tetrabromobenzotriazole) и ТВВ одновременно с вортманнином не вызывает изменений в распределении клеток по фазам клеточного цикла ни в нормальных условиях культивирования, ни в условиях сывороточного голодания (рис. 3, б).

Анализ активности киназ *in vitro* показал, что в результате культивирования ЭСК с LY294002 как в нормаль-

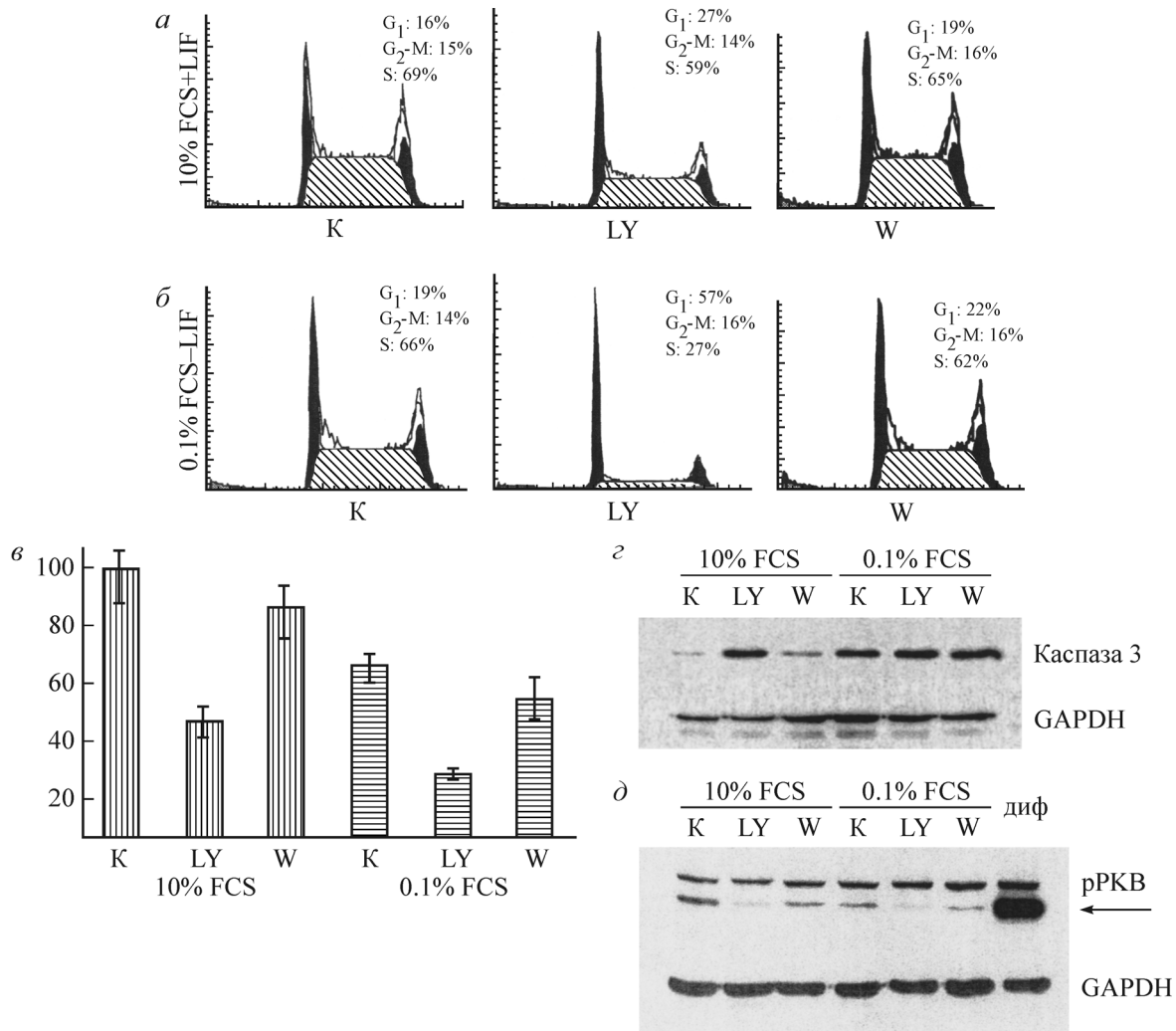


Рис. 2. Влияние ингибиторов PI3-киназы на пролиферацию (а, б), численность популяции (в), гибель (z) ЭСК и активность сигнального каскада PI3K → PKB (д).

а, б — распределение ЭСК по фазам клеточного цикла после обработки ингибиторами PI3-киназы LY294002 (40 мкМ) и вортманнином (1 мкМ): а — в нормальных условиях культивирования (10 % FCS, в присутствии LIF), б — в условиях сывороточного голодания (0.1 % FCS, без LIF); по оси абсцисс — содержание ДНК, отн. ед.; по оси ординат — количество клеток. Время действия ингибиторов 17 ч. в — оценка жизнеспособности ЭСК по МТТ-тесту через 24 ч обработки ингибиторами PI3-киназы. z, д — содержание активной формы каспазы 3 (z) и фосфорилированной формы PKB (д) в ЭСК после обработки ингибиторами PI3-киназы (иммуноблотинг). К — клетки без воздействия, LY — клетки, обработанные LY 294002 (40 мкМ), W — клетки, обработанные вортманнином (500 нМ). Положительный контроль — дифференцированные ЭСК. Время действия ингибиторов 17 ч. Иммуноблот на GAPDH — в качестве контроля нагрузки.

ных условиях, так и при сывороточном голодании в клетках снижается киназная активность комплексов, ассоциированных с циклином E (рис. 4, а). Культивирование с вортманнином и сывороточное голодание не вызывают снижения ассоциированной с циклином E киназной активности.

В комплекс с циклином E входит в первую очередь киназа Cdk2. Обработка ЭСК ингибитором киназы Cdk2 росковитином вызывает накопление клеток в фазах G₁ и G₂ и снижение доли клеток в фазе S (рис. 4, б). Этот эффект росковитина особенно сильно проявляется в условиях сывороточного голодания: содержание клеток в фазе S снижается до 38 % по сравнению с 63 % в контрольной популяции, доля клеток в фазах G₁ и G₂ возрастает до 39 и 22 % соответственно (рис. 4, б).

Обработка ЭСК LY294002 приводит к значительному уменьшению количества циклина D1 как на уровне

mРНК, так и на уровне белка (рис. 5, а, б). Вортманнин так же негативно влияет на содержание белка циклин D1, но количество транскрипта гена *циклина D1* существенно не изменяется. В результате обработки клеток LY294002 уменьшается содержание циклинов A и E на уровне белка, но не на уровне mРНК. Ни LY294002, ни вортманнин не вызывают усиления транскрипции и накопления ингибитора циклин-киназных комплексов p27^{kip1}, количество которого заметно увеличивается в результате дифференцировки ЭСК (рис. 5, а).

Обсуждение

ЭСК в условиях *in vitro* иммортальны, т. е. могут пройти неограниченное число пассажей, сохраняя при этом способность к дифференцировке; в недифференци-

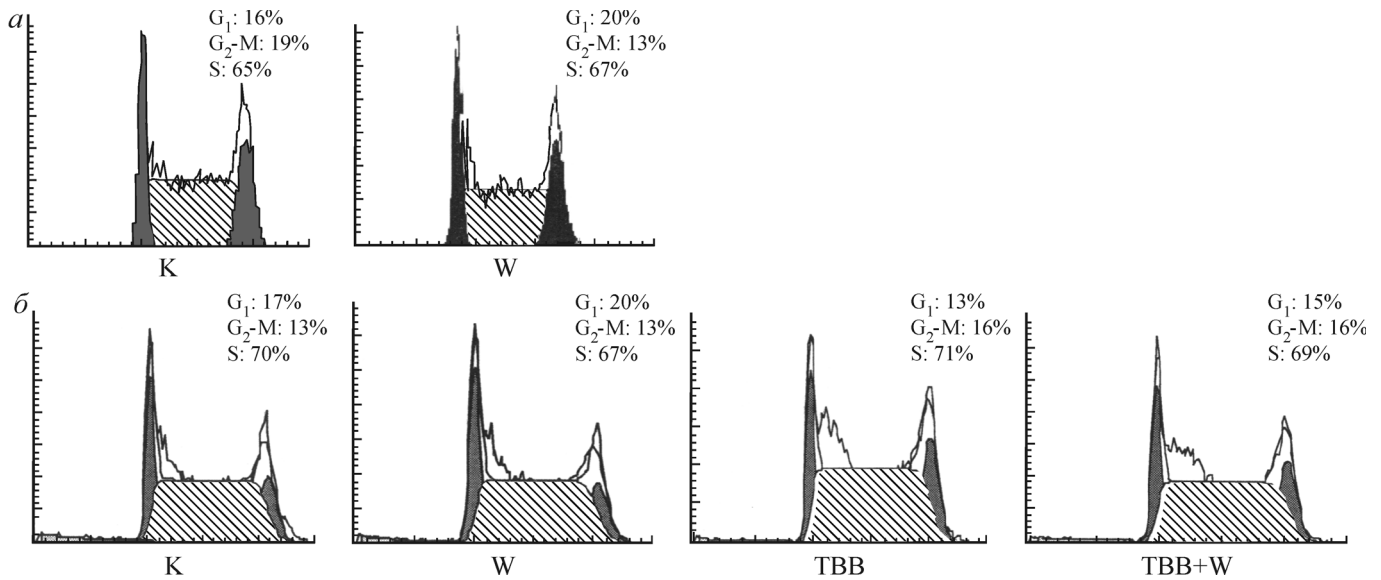


Рис. 3. Распределение ЭСК по фазам клеточного цикла после обработки вортманнином в высокой концентрации (а), а также после одновременной обработки вортманнином и ингибитором киназы СК2 ТВВ (б).

а — через 9 ч обработки вортманнином (1 мкМ), среда с ингибитором обновлялась каждые 1.5 ч; б — через 17 ч обработки ЭСК вортманнином (500 нМ) и ТВВ (50 мкМ) по отдельности или совместно в условиях сывороточного голодания (0.1 % FCS –LIF); по оси абсцисс — содержание ДНК, отн. ед.; по оси ординат — количество клеток.

рованном состоянии ЭСК не способны вступать в фазу репликативного покоя (G₀) (Schratt et al., 2001; Малашичева и др., 2002).

Соматические клетки, например фибробласты, в отсутствие ростовых факторов в среде культивирования прекращают пролиферировать, останавливаясь в фазе G₁. Молекулярные механизмы, лежащие в основе зависимости клеточного цикла фибробластов грызунов от ростовых факторов, уже достаточно хорошо изучены. В частности, известно, что в клетке, находящейся в фазе

G₁ (самой продолжительной по времени фазе клеточного цикла), стимуляция ростовыми факторами приводит к синтезу и стабилизации циклинов D и E и сборке активных циклин-зависимых комплексов, которые и определяют начало фазы синтеза ДНК. Для того, чтобы завершить фазу G₁ и вступить в фазу синтеза ДНК, клетке необходимо получить митогенные сигналы от ростовых факторов в начале фазы G₁. В связи с этим в фазе G₁ выделяют условную точку рестрикции R (restriction point), преодолев которую клетки могут перейти из фазы G₁ в фазу синтеза ДНК и закончить митотический цикл. До преодоления точки R клетка чувствительна к наличию ростовых факторов среде культивирования, после прохождения через точку R клетка уже не нуждается во внешних митогенных сигналах для продолжения клеточного цикла. Известно, что для преодоления точки рестрикции необходима последовательная активация сначала MEK/Erk-, а затем PI3K-зависимых каскадов. По этому принципу фазу G₁ делят на раннюю стадию (G_{E1}), прохождение по которой стимулирует MEK/Erk-зависимый каскад, и позднюю (G_{I1}), зависимую от PI3-киназы (Jones, Kazlauskas, 2001).

В отличие от фибробластов ЭСК не останавливаются в фазе G₁ в отсутствие ростовых факторов в среде куль-

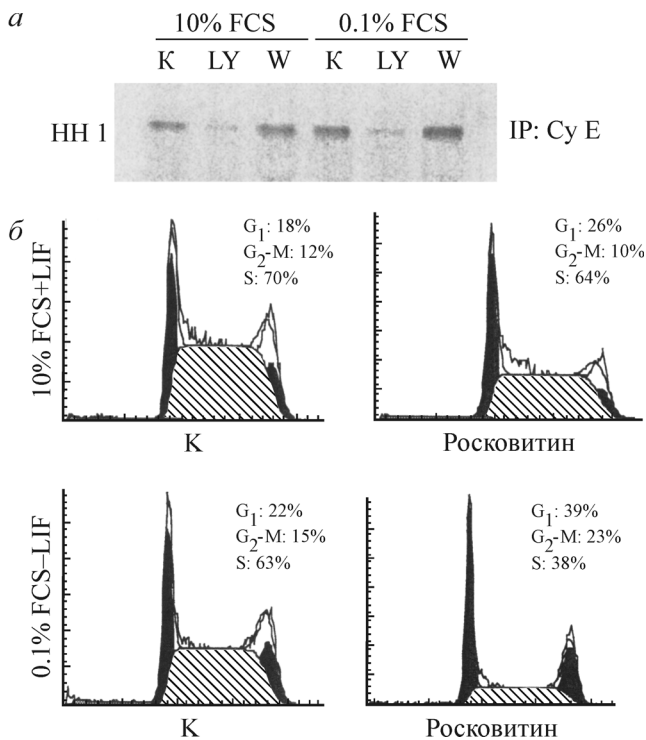


Рис. 4. Киназная активность комплексов, ассоциированных с циклином E в ЭСК, обработанных ингибиторами PI3-киназы (а), и распределение ЭСК по фазам клеточного цикла после обработкой ингибитором Cdk2 росковитином (б).

а — киназная активность белковых комплексов, ассоциированных с циклином E (Cy E), через 8 ч обработки ЭСК ингибиторами PI3-киназы; К — клетки без воздействия, LY — клетки, обработанные LY294002 (40 мкМ), W — клетки, обработанные вортманнином (500 нМ). б — распределение ЭСК по фазам клеточного цикла через 17 ч обработки ингибитором Cdk2 росковитином (10 мкМ) в нормальных условиях (10 % FCS, в присутствии LIF) и при сывороточном голодании (0.1 % FCS –LIF); по оси абсцисс — содержание ДНК, отн. ед.; по оси ординат — количество клеток.

тивирования (Schratt et al., 2001). Клеточный цикл ЭСК очень короткий — около 10 ч, а фаза G₁ занимает примерно 1.5 ч. Эти параметры ЭСК существенно отличаются от параметров других клеток, например фибробластов, митотический цикл которых длится дольше, а G₁ является самой продолжительной фазой. Предполагают, что скорость пролиферации ЭСК и ее автономность от митогенных сигналов связаны именно с редукцией чувствительной к внешним сигналам части фазы G₁ (до точки рестрикции). Вероятно, активность сигнальных каскадов, стимулирующих переход G₁ → S в ЭСК, поддерживается на определенном уровне, достаточном для продолжения пролиферации даже в отсутствие ростовых факторов в среде культивирования. Какие именно сигнальные каскады обуславливают переход G₁ → S в ЭСК, пока неизвестно. Относительно роли MEK/Erk-сигнального пути в ЭСК известно, что он выполняет скорее про-дифференцировочную роль, нежели про-пролиферативную, поскольку ЭСК, в которых этот каскад инактивирован с помощью ингибиторов (рис. 1, а) или мутаций, продолжают пролиферировать на прежнем уровне, но утрачивают способность к дифференцировке (Burdon et al., 1999, 2002).

К настоящему времени есть данные, косвенно свидетельствующие о том, что каскад, зависимый от PI3-киназы, является стимулятором пролиферации ЭСК. Недавно был описан конститутивно активный белок семейства Ras, который получил название ERas, так как его экспрессия специфична только для ЭСК (Takahashi et al., 2003). Эти авторы показали, что ERas активирует PI3-киназу, непосредственно взаимодействуя с ее субъединицами p85 и p110δ, а ЭСК, лишённые гена *eras*, обладают замедленной пролиферацией (Takahashi et al., 2003).

Уже в первые дни дифференцировки ЭСК, индуцированной ретиноевой кислотой, доля клеток в фазе S уменьшается и экспрессия гена *eras* существенно снижается (рис. 1, б, в). Интересно, что активность сигнального каскада PI3K → PKB, напротив, увеличивается в ходе дифференцировки (рис. 2, д). По-видимому, в недифференцированных ЭСК белок ERas обеспечивает активацию PI3-киназы на некотором уровне, необходимом и достаточном для пролиферации и выживания недифференцированных клеток. Вероятно, этого уровня активности PI3-киназы недостаточно для выживания дифференцированных клеток. В процессе дифференцировки ERas перестает экспрессироваться, а каскад PI3K → PKB увеличивает свою активность благодаря другим активаторам, возможно за счет контактов с внеклеточным матриксом, которые в дифференцированных клетках развиты гораздо лучше, чем в недифференцированных.

Известно, что ингибитор PI3-киназы LY294002 в концентрации 40 мкМ вызывает быстрое накопление ЭСК в фазе G₁ клеточного цикла, а более низкие концентрации (до 20 мкМ) не вызывают блока клеточного цикла, но провоцируют дифференцировку клеток (Jirmanova et al., 2002; Paling et al., 2004). Интересно, что до сих пор ничего не сообщалось о влиянии другого фармакологического ингибитора PI3-киназы — вортманнина — на ЭСК, в то время как его действие на фибробласты описано и совпадает с действием LY294002 — они оба вызывают накопление ингибитора циклин-киназных комплексов белка p27^{kip1} и остановку клеток в фазе G₁ (Collado et al., 2000).

В нашей работе мы применили к ЭСК мыши оба ингибитора PI3-киназы и обнаружили, что они различают-

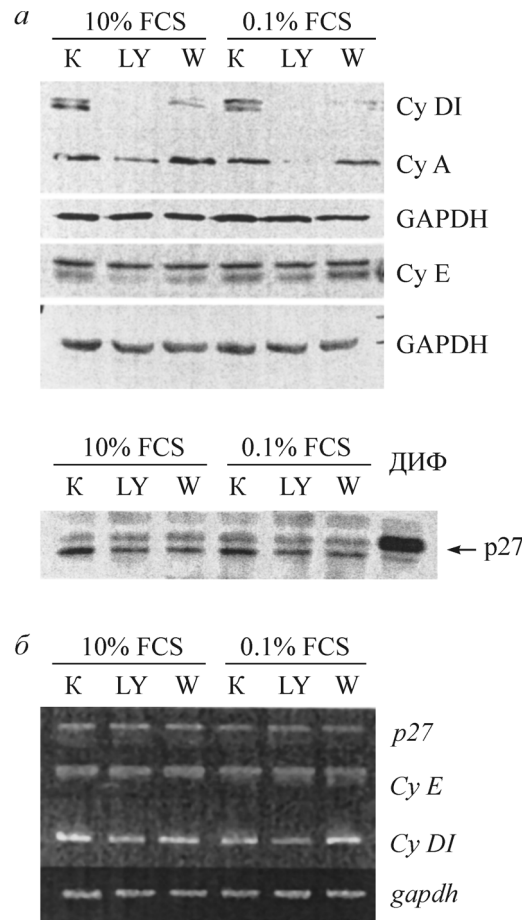


Рис. 5. Влияние LY294002 и вортманнина на экспрессию регуляторов клеточного цикла: ингибитора циклин-киназных комплексов p27^{kip1}, циклинов (Cy) D1, E и A.

а — вестерн-блоттинг; в качестве положительного контроля к белку p27^{kip1} использованы лизаты дифференцированных ЭСК. б — экспрессия генов; метод ОТ-ПЦР. GAPDH (а) и *gapdh* (б) — в качестве контроля нагрузки. Время обработки 8 ч.

ся по своему влиянию на клеточный цикл. Анализ параметров клеточного цикла после 17-часовой культивации ЭСК мыши с ингибиторами PI3-киназы показал, что если клетки обрабатывались ингибиторами в присутствии 10 % FCS и фактора LIF, то LY294002 вызывал некоторое снижение количества клеток в фазе S (с 68 до 59 %) и накопление в фазе G₁ (до 26 % по сравнению с 15 % в контроле), а вортманнин не оказывал влияния на распределение клеток по фазам клеточного цикла (рис. 2, а). Если клетки обрабатывали ингибиторами в условиях сывороточного голодания (0.1 % FCS, без фактора LIF), то LY294002 вызывал существенное накопление клеток в фазе G₁ (до 57 %), а вортманнин по-прежнему не оказывал значительного влияния на распределение клеток по фазам клеточного цикла, несмотря на высокую концентрацию (1 мкМ; рис. 2, б).

Несмотря на то что вортманнин не оказывал выраженного влияния на распределение клеток по фазам клеточного цикла, он негативно влиял на жизнеспособность ЭСК (рис. 2, в). Для оценки количества живых клеток в популяциях, обработанных ингибиторами PI3-киназы в течение 24 ч, был применен МТТ-тест. Количество живых клеток в популяциях, обработанных LY294002, существенно ниже, чем в контрольных популяциях; нега-

тивное влияние вортманнина слабее, чем влияние LY294002. Численность популяции определяется балансом двух процессов — деления и гибели клеток. Чтобы проверить, вызывают ли ингибиторы PI3-киназы апоптотическую гибель ЭСК, мы оценили с помощью вестерн-блоттинга количество в клетках активной каспазы 3, наличие которой является свидетельством апоптоза. Результат представлен на рис. 2, г. Сывороточное голодание само по себе вызывает апоптоз у ЭСК, и в этих условиях влияние ингибиторов PI3-киназы оценить сложно. Но для популяций, обработанных ингибиторами в присутствии сыворотки и фактора LIF, видно, что оба ингибитора вызывают накопление активной каспазы 3, причем LY294002 в значительно большей степени, чем вортманнин. После обработки LY294002 существенное снижение численности популяции ЭСК происходит как за счет остановки клеток в фазе G_1 , так и за счет индукции апоптоза, в то время как вортманнин, вероятно, снижает численность популяции ЭСК в основном за счет индукции апоптоза. По-видимому, в ЭСК мыши активность PI3-киназы необходима в первую очередь для выживания, но не играет определяющей роли в регуляции событий клеточного цикла.

Одним из ключевых участников каскада, зависящего от PI3-киназы, является белок PKB. Активная PI3-киназа стимулирует фосфорилирование и активацию PKB. При действии обоих ингибиторов PI3-киназы количество фосфорилированной формы PKB в ЭСК снижается (рис. 2, д). Однако ингибитор LY294002 вызывает более заметное снижение количества p-Ser473-PKB. Это означает, что LY294002 гораздо эффективнее, чем вортманнин, инактивирует путь PI3K → PKB.

Полагают, что вортманнин менее стабилен в водной среде по сравнению с LY294002. Поэтому для подтверждения отсутствия влияния вортманнина на распределение ЭСК мыши по фазам клеточного цикла мы культивировали клетки в присутствии 1 мкМ вортманнина в течение 9 ч, обновляя среду с ингибитором каждые 1.5 ч. Тем не менее и в этих условиях доля клеток в S-фазе оставалась по-прежнему высокой, накопления клеток в фазе G_1 не наблюдали (рис. 3, а). Таким образом, отсутствие эффекта вортманнина на пролиферацию ЭСК нельзя объяснять его нестабильностью. Наши данные свидетельствуют о том, что при культивации ЭСК с вортманнином сигнальный каскад, зависящий от PI3-киназы не полностью, но все же инактивируется, судя по снижению количества фосфорилированной формы киназы PKB (рис. 2, д), в то время как распределение клеток по фазам клеточного цикла остается неизменным (рис. 2, а, б; 3, а). Кроме того, другие авторы сообщают о блоке клеточного цикла фибробластов, вызванном гораздо меньшей, чем использованная в наших экспериментах, концентрацией вортманнина — 10 нМ (Collado et al., 2000). По-видимому, недостаточная инактивация PI3-киназы вортманнином не является причиной различий в эффектах LY294002 и вортманнина на пролиферацию ЭСК.

Наиболее вероятная причина различий в действии LY294002 и вортманнина может заключаться в том, что помимо PI3-киназы они подавляют активности других киназ. Причем у LY294002 и вортманнина спектры ингибируемых киназ разные. В частности, известно, что LY294002 блокирует активность казеинкиназы 2 (СК2) с той же эффективностью, что и PI3-киназу, в то время как вортманнин не влияет на активность СК2, но существенно ингибирует киназу SMLCK (Smooth Muscle Light

Chain Kinase) (Davies et al., 2000). Поскольку именно LY294002 подавляет переход $G_1 \rightarrow S$ в ЭСК мыши, логично предположить, что киназы (или комплекс киназ), инактивируемые LY294002, инициируют вступление в фазу синтеза ДНК.

Обрабатывая клетки ингибитором СК2 ТВВ вместе с вортманнином и отдельно от вортманнина, мы ожидали увидеть LY294002-подобный эффект. Однако снижение доли клеток в фазе S и накопления клеток в фазе G_1 не произошло (рис. 3, б). По-видимому, активности СК2 и PI3-киназы не являются обязательным условием для перехода $G_1 \rightarrow S$ в ЭСК мыши.

Регуляторами перехода в фазу синтеза ДНК являются комплексы циклин E—Cdk2. События фазы G_1 направлены на то, чтобы стимулировать синтез циклина E и сборку активных комплексов. Существует мнение о том, что быстрая и автономная пролиферация ЭСК мыши обусловлена постоянно высокой, нерегулируемой активностью комплексов циклин E—Cdk2 и циклин A—Cdk2 (Stead et al., 2002). В наших опытах уровень активности циклин E-содержащих комплексов коррелировал с изменениями клеточного цикла: в клетках, обработанных LY294002, киназная активность комплексов циклин E—Cdk2 снижалась, а в клетках, обработанных вортманнином, оставалась неизменной (рис. 4, а).

Чтобы выяснить, как влияет инактивация Cdk2 на распределение ЭСК по фазам клеточного цикла, мы применили фармакологический ингибитор киназы Cdk2 росковитин. Результаты представлены на рис. 4, б. Обработка ЭСК росковитином приводила к заметному уменьшению доли клеток в фазе S (до 38 % в условиях сывороточного голодания), но LY294002 сильнее снижал долю клеток в фазе S (до 27 % в условиях сывороточного голодания; рис. 2, б). Это свидетельствует о том, что эффект LY294002 отчасти может быть опосредован его негативным действием на Cdk2-содержащие комплексы.

Известно, что каскад, зависящий от PI3-киназы, подавляет транскрипцию гена, кодирующего ингибитор циклин-киназных комплексов $p27^{kip1}$. В фибробластах инактивация PI3-киназы приводит к активации транскрипционных факторов семейства FoxO и последующей транскрипции гена $p27^{kip1}$. В результате накопления ингибитора $p27^{kip1}$ происходит инактивация циклин-киназных комплексов и остановка клеточного цикла. Однако в ЭСК мыши ингибиторы PI3-киназы не вызывают усиления транскрипции и накопления белка $p27^{kip1}$ (рис. 5, а, б). Таким образом, в ЭСК мыши LY294002 приводит к снижению циклин E-ассоциированной активности по $p27^{kip1}$ -независимому механизму. Возможно, падение циклин E-ассоциированной активности вызвано уменьшением количества белка циклина E (рис. 5, а).

В ЭСК мыши обработка LY294002 и вортманнином приводит к уменьшению количества циклина D1 (рис. 5, а). Влияние PI3-киназы на содержание циклина D1 описано и на других клеточных моделях. Оно опосредовано киназой GSK3, которая направляет циклин D1 на протеасомную деградацию. Кроме этого, культивирование клеток с ингибиторами PI3-киназы приводит к снижению уровня транскрипции циклина D1 (рис. 5, в). Это может происходить благодаря действию репрессоров транскрипции семейства FoxO, которые негативно регулируются каскадом, зависящим от PI3-киназы (Schmidt et al., 2002). Очевидно, что снижения количества цикли-

на D1 недостаточно для изменения пролиферации, поскольку как вортманнин, так и LY294002 вызывают падение количества циклина D1, но пролиферация нарушается только в клетках, обработанных LY294002. Кроме того, другие авторы предполагают, что пролиферация ЭСК мыши происходит независимо от активности комплексов циклин D1—Cdk4,6 (Savatier et al., 1996).

LY294002 вызывает заметное уменьшение количества циклина A в ЭСК мыши (рис. 5, в). Вопрос о том, чем опосредовано это влияние, пока остается без ответа. Не исключено, что наблюдаемое снижение количества циклина A происходит не благодаря инактивации PI3-киназы, а благодаря инактивации ингибитором LY294002 какого-то другого фермента.

В результате наших исследований мы убедились в том, что LY294002 (но не вортманнин) вызывает в ЭСК мыши падение циклин E-ассоциированной активности и накопление клеток в фазе G₁ клеточного цикла. С одной стороны, в ходе длительной культивации (17 ч) вортманнин слабее, чем LY294002, инактивирует каскад PI3K → PKB, что отчасти может быть причиной отсутствия эффекта вортманнина на циклин E-ассоциированную активность и пролиферацию в ЭСК. С другой стороны, действия вортманнина достаточно для заметного снижения количества циклина D1 и фосфорилированной формы киназы PKB. Это наблюдение свидетельствует в пользу того, что PI3-киназа не играет определяющей роли в регуляции пролиферации ЭСК и ослабление ее активности само по себе недостаточно для запрета перехода G₁ → S в данном типе клеток. Это согласуется с результатами, полученными на ЭСК, лишенных одной из субъединиц (p85α) PI3-киназы (Hallmann et al., 2003). У таких клеток повышен уровень апоптоза, но доля клеток в фазе S снижена лишь на несколько процентов по сравнению с клетками дикого типа. По-видимому, в ЭСК активность каскада, зависящего от PI3-киназы, необходима в первую очередь для выживания клеток и лишь в некоторой степени влияет на пролиферацию. Интересной особенностью ЭСК оказалось то, что в этих клетках инактивация PI3-киназы не приводит к накоплению ингибитора циклин-киназных комплексов белка p27^{kip1}. Это означает, что вызванные LY294002 снижение циклин E-ассоциированной активности и накопление ЭСК в фазе G₁ происходят, вероятно, по p27^{kip1}-независимому механизму.

Авторы выражают благодарность проф. Л. Пинна (Университет г. Падова, Италия) за любезно предоставленный ингибитор киназы 2 ТВВ.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 03-04-49377 и 06-04-49058), грантов НАТО № 979190, CRDF № RB1-2511-ST-03 и программы фундаментальных исследований президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

Список литературы

Малашичева А. Б., Кислякова Т. В., Саватьер П., Поспелов В. А. 2002. Эмбриональные стволовые клетки не вступают в арест клеточного цикла под воздействием ДНК-повреждающих факторов. Цитология. 44 (7) : 643—648.

Burdon T., Smith A., Savatier P. 2002. Signalling, cell cycle and pluripotency in embryonic stem cells. Trends Cell Biol. 12 : 432—438.

Burdon T., Stracey C., Chambers I., Nichols J., Smith A. 1999. Suppression of SHP-2 and ERK signalling promotes self-renewal of mouse embryonic stem cells. Develop. Biol. 210 : 30—43.

Collado M., Medema R. H., Garcia-Cao I., Dubuisson M. L., Barradas M., Glassford J., Rivas C., Burgering B. M., Serrano M., Lam E. W. 2000. Inhibition of the phosphoinositide 3-kinase pathway induces a senescence-like arrest mediated by p27Kip 1. J. Biol. Chem. 275 : 21 960—21 968.

Davies S. P., Reddy H., Caivano M., Cohen P. 2000. Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. Biochem. J. 351 : 95—105.

El-Kholy W., Macdonald P. E., Lin J. H., Wang J., Fox J. M., Light P. E., Wang Q., Tsushima R. G., Wheeler M. B. 2003. The phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor LY294002 potently blocks K(V) currents via a direct mechanism. FASEB J. 7 : 720—722.

Gross V. S., Hess M., Cooper G. M. 2005. Mouse embryonic stem cells and preimplantation embryos require signaling through the phosphatidylinositol 3-kinase pathway to suppress apoptosis. Mol. Reprod. Develop. 70 : 324—332.

Hallmann D., Trumper K., Trusheim H., Ueki K., Kahn C. R., Cantley L. C., Fruman D. A. 2003. Altered signaling and cell cycle regulation in embryonic stem cells with a disruption of the gene for phosphoinositidase 3-kinase regulatory subunit p85α. J. Biol. Chem. 278 : 5099—5108.

Jirmanova L., Afanassieff M., Gobert-Gosse S., Markossian S., Savatier P. 2002. Differential contributions of ERK and PI3-kinase to the regulation of cyclin D1 expression and to the control of the G₁/S transition in mouse embryonic stem cells. Oncogene. 21 : 5518—5528.

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

Kukushkin A. N., Abramova M. V., Svetlikova S. B., Darieva Z. A., Pospelova T. V., Pospelov V. A. 2002. Downregulation of *c-fos* gene transcription in cells transformed by E1A and *cHa-ras* oncogenes: a role of sustained activation of MAP/ERK kinase cascade and of inactive chromatin structure at *c-fos* promoter. Oncogene. 21 : 719—730.

Paling N. R., Wheadon H., Bone H. K., Welham M. J. 2004. Regulation of embryonic stem cell self-renewal by phosphoinositide 3-kinase-dependent signaling. J. Biol. Chem. 279 : 48 063—48 070.

Savatier P., Lapillonne H., van Grunsven L. A., Rudkin B. B., Samarut J. 1996. Withdrawal of differentiation inhibitory activity/leukemia inhibitory factor up-regulates D-type cyclins and cyclin-dependent kinase inhibitors in mouse embryonic stem cells. Oncogene. 12 : 309—322.

Schmidt M., Fernandez de Mattos S., van der Horst A., Klomp-maker R., Kops G. J., Lam E. W., Burgering B. M., Medema R. H. 2002. Cell cycle inhibition by FoxO forkhead transcription factors involves downregulation of cyclin D. Mol. Cell. Biol. 22 : 7842—7852.

Schratt G., Weinhold B., Lundberg A. S., Schuck S., Berger J., Schwarz H., Weinberg R. A., Ruther U., Nordheim A. 2001. Serum response factor is required for immediate-early gene activation yet is dispensable for proliferation of embryonic stem cells. Mol. Cell. 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.

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

Walker E. H., Pacold M. E., Perisic O., Stephens L., Hawkins P. T., Wymann M. P., Williams R. L. 2000. Structural determinants of phosphoinositidase 3-kinase inhibition by wortmannin, LY294002, quercetin, myricetin, and staurosporine. Mol. Cell. 6 : 909—919.

PI3-KINASE INHIBITORS LY294002 AND WORTMANNIN HAVE DIFFERENT EFFECTS ON PROLIFERATION OF MURINE EMBRYONIC STEM CELLS

M. S. Lianguzova,^{1,} I. A. Chuykin,¹ A. Nordheim,² V. A. Pospelov¹*¹ Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, Russia, and ² Tuebingen University, Tuebingen, Germany;
* e-mail: lianguzova@gmail.com

Murine embryonic stem (mES) cells can proliferate independently of the presence of growth factors in the medium. It is yet unknown what intrinsic activity triggers cell cycle events in mES cells. Here we investigated the contribution of the PI3-kinase cascade to autonomous proliferation of mES cell using PI3-kinase inhibitors wortmannin and LY294002. Wortmannin displays a weaker inhibitory effect on phosphorylation of PI3-kinase pathway target PKB as compared with LY294002, and does not downregulate mES cells proliferation, while LY294002 causes a strong decrease in the share of cells in S-phase and accumulation of cells in G₁ phase. Both inhibitors cause significant decrease in cyclin D1 amount. The treatment with LY294002, rather than with wortmannin results in a decrease of cyclin E amount and cyclin E-associated kinase activity. In mES cells, inactivation of PI3-kinase-dependent pathway and G₁ arrest are not accompanied by induction of p27^{kip1} transcription and accumulation of this inhibitor of cyclin-cdk complexes at the protein level, implying that these events accomplished by some p27^{kip1}-independent mechanism. Both LY294002 and wortmannin cause apoptotic death of mES cells and downregulate the growth of population. Thus, inactivation of PI3-kinase in mES cells may lead to apoptosis rather than to cell cycle arrest.

Key words: murine embryonic stem cells, proliferation, PI3-kinase, LY294002, wortmannin.
