

АНАЛИЗ ПРОТЕИНКИНАЗ, ПРЕИМУЩЕСТВЕННО ЭКСПРЕССИРУЮЩИХСЯ В ЛИНИЯХ ЭСК ЧЕЛОВЕКА В ПРОЦЕССЕ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ

© Е. С. Филоненко, П. Ю. Волчков, И. А. Муфазалов, С. Л. Киселев, М. А. Лагарькова¹

Институт биологии гена РАН, Москва;

¹ *электронный адрес: maryalag@yahoo.com*

Способность к неограниченной пролиферации и дифференцировке делает эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) человека привлекательным объектом для фундаментальной науки и современной медицины. Мало известно о механизмах, направляющих клетки в дифференцировку по тому или иному пути или удерживающих их в недифференцированном состоянии. Активация этих механизмов во многом определяется экспрессией генов, опосредованной каскадами передачи сигналов. Важным компонентом сигнальных путей являются протеинкиназы. Изучение экспрессии протеинкиназ в ЭСК и эмбрионидных тельцах (ЭТ) позволит приблизиться к пониманию процессов, происходящих на ранних этапах дифференцировки. Нами были получены библиотеки кДНК, содержащие фрагменты каталитического домена протеинкиназ, экспрессирующихся в ЭСК и ЭТ линий hESM01 и hESM02. Методом Нозерн-гибридизации обнаружен высокий уровень экспрессии протеинкиназы MAK-V в ЭСК человека. Полуколичественным методом ОТ-ПЦР проведено сравнение уровня экспрессии протеинкиназ MAK-V, A-RAF-1, MAPK3, IGF1R, NEK3 и NEK7 в ЭСК и ЭТ линий hESM01 и hESM02.

Ключевые слова: ЭСК человека, экспрессия, протеинкиназы, дифференцировка.

Процессы клеточной дифференцировки, протекающие на ранних стадиях эмбриогенеза от стадии морулы до стадии преимплантационного эмбриона, сопровождаются появлением дивергентных линий клеток: трофобластодермы, которая дает начало цитотрофобластам и синцитиотрофобластам плаценты, и внутренней клеточной массы бластоцисты, которая дифференцируется во все остальные типы клеток. Эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) получают из внутренней клеточной массы бластоцисты. Они обладают способностью к самоподдержанию и плюрипотентностью, способностью дифференцироваться во все типы клеток, производные трех зародышевых листков. Наряду с этими способностями и с совокупностью ряда генетических и морфологических характеристик ЭСК *in vitro* являются аппроксимированным экспериментальным объектом, эквивалентным клеткам внутренней клеточной массы бластоцисты, и, таким образом, представляют собой доступную модель раннего эмбриогенеза. На сегодняшний день получены ЭСК многих видов, в том числе мышей (Evans, Kaufman, 1981; Martin, 1981), приматов и человека (Thomson et al., 1998; Reubinoff et al., 2000). Общей для всех линий ЭСК является способность формировать эмбрионидные тельца (ЭТ). Процессы, протекающие во время дифференцировки ЭСК в ЭТ, являются предметом изучения как модельная система, эквивалентная дифференцировке клеток внутренней клеточной массы бластоцисты. Изучение изменения уровня экспрессии генов позволит приблизиться к пониманию процессов ранней эмбриональной дифференцировки.

Существует множество методов идентификации и определения уровня экспрессии генов: вычитающая гибридизация, дифференциальный дисплей, репрезентативный дифференциальный анализ (RDA), серийный анализ экспрессирующихся генов (SAGE) и микрочипы. Для идентификации и определения уровня экспрессии генов при дифференцировке ЭСК в ЭТ мы остановились на методе, использовавшемся в работе Уилкса (Wilks, 1989). Это позволило нам работать с определенной группой генов — киназами, которые отчетливо характеризуют процессы, протекающие в клетках.

Эукариотические протеинкиназы представляют собой одно из обширнейших белковых суперсемейств. Фосфорилирование белков, осуществляемое протеинкиназами, общепризнанно является одним из наиболее важных способов регуляции функции белков в эукариотической клетке. Фосфорилирование белков является одним из механизмов, опосредующих клеточные ответы на внеклеточные сигналы, а также события, происходящие в определенные моменты клеточного цикла.

Материал и методика

Клеточные линии. В работе использованы следующие клеточные линии: тератокарцинома человека NTERA2A (клон D1); первичные эмбриональные мышечные фибробласты (МЭФ), выделенные из 12-суточных эмбрионов мыши; линии человеческих ЭСК hESM01 и hESM02 (Lagarkova et al., 2006). ЭСК культивировали

при 37 °С и 5 % CO₂ на фидерном слое МЭФ, инактивированных митомцином С. Для получения ЭТ удаляли фидерный слой обработкой в течение 15 мин коллагеназой IV (1 мг/мл), колонии соскабливали пластиковым наконечником, осторожно диссоциируя на фрагменты (400—600 клеток), и переносили на чашки, покрытые 2%-ной агарозой. На следующий день ЭСК формировали плавающие округлые агрегаты. Через 4—5 сут культивирования образовывались ЭТ.

ОТ-ПЦР и клонирование протеинкиназ. Выделение тотальной РНК из образцов производили с использованием RNeasy® Mini Kit (QIAGEN, Германия). Фрагменты кДНК протеинкиназ, экспрессирующихся в ЭСК и ЭТ, были амплифицированы в ОТ-ПЦР на матрице тотальной РНК. Для проведения реакции обратной транскрипции использовали шестинуклеотидную рассеянную затравку (Amersham Biosciences, Англия), фермент M-MLV RT (Promega, США), ингибитор рибонуклеаз (RNasin, Promega, США) и dNTP (Promega, США). ПЦР проводили с использованием Taq-полимеразы (ООО «Бионем», Россия) и праймеров (НПФ «Литех», Россия): ПК-1 — 5'-atccac(A/C)gNga(C/T)(C/T)t-3' и ПК-2 — 3'-cca(a/t)aggacca(g/c)ac(g/a)tc-5' в следующих условиях: 94 °С, 40 с; 40 °С, 2 мин; 72 °С, 20 с; 35 циклов. Последовательности олигонуклеотидов, используемые для определения уровня экспрессии протеинкиназ: IGF1R (ПЦР-продукт 133 н. п.); прямой — 5'-CATGGTGGAGAACGACCATA-3'; обратный — 5'-CCACTTCACGATTAACGAGA-3'; MAK-V (ПЦР-продукт 129 н. п.); прямой — 5'-GTACCAGAAGATGGTAGA-CAA-3', обратный — 5'-GCCAGTGCCTGCTGAA-TATT-3'; A-raf-1 (ПЦР-продукт 176 н. п.); прямой — 5'-CAGGCTTTCAAGAATGAGAT-3', обратный — 5'-ATGAGCTGGACCATGTCCGAA-3'. Условия амплификации следующие: 94 °С, 40 с; X °С, 45 с; 72 °С, 20 с; 27—35 циклов. РНК человеческого GAPD использовали как контроль количества матрицы для ПЦР. Последовательности праймеров для GAPD (ПЦР-продукт 402 н. п.): прямой — 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTCA-3', обратный — 5'-TTCACACCCATGACGAACAT-3'. Амплификацию проводили при следующих условиях: 94 °С 60 с; 56 °С, 45 с; 72 °С, 30 с; 24 цикла. Клонирование ПЦР-фрагментов осуществляли, используя рGEM®-T Easy Vectors System I (Promega, США). Для трансформации использовали компетентные клетки *E. coli* JM 109 (Promega, США). Плазмидную ДНК выделяли методом щелочного лизиса (Sambrook et al., 1989a). Секвенирование плазмидной ДНК проводили в ЦКП «Геном».

Гибридизация нуклеиновых кислот. Гибридизацию бактериальных колоний *in situ* и Нозерн-гибридизацию проводили по Маниатису (Sambrook et al., 1989b, 1989c) на мембранах Hybond-N (Amersham Biosciences, Англия). Зонды для гибридизации получали с помощью Megaprime labeling kit (Amersham Biosciences, Англия). Детекцию осуществляли на приборе Cyclone (Packard).

Результаты

Для протеинкиназ характерно наличие в полипептидной цепи гомологичных каталитических доменов, состоящих из 250—300 аминокислотных остатков (Hardie, Hanks, 1995). 12 аминокислотных остатков киназного домена являются практически инвариантными для всех

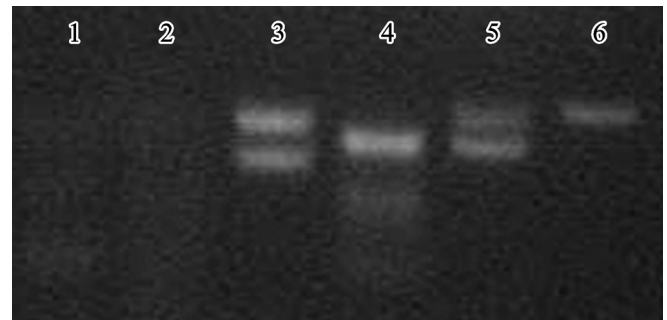


Рис. 1. Гель-электрофорез продуктов ОТ-ПЦР с использованием вырожденных праймеров на каталитический киназный домен.

Дорожки: 1 — ОТ-ПЦР, отрицательный контроль; 2 — ПЦР, отрицательный контроль; 3 — маркер, нижняя полоса — 117 н. п.; 4 — ПЦР-продукт (220 н. п.), соответствующий части каталитического домена протеинкиназ, экспрессирующихся в ЭСК линии hESM01; 5 — маркер, нижняя полоса — 213 н. п.; 6 — маркер, 1 kb DNA Ladder, нижняя полоса 250 н. п.

представителей суперсемейства. Это позволяет подобрать праймеры, комплементарные каталитическому домену.

С использованием праймеров ПК-1 и ПК-2 на матрице тотальной РНК был амплифицирован набор фрагментов длиной около 220 н. п., соответствующий части каталитического домена протеинкиназ (рис. 1).

Полученные фрагменты клонировали в плазмидный вектор. Таким образом, были созданы четыре библиотеки клонов. Амплификацию проводили с использованием РНК из ЭСК человека линий hESM01 и hESM02 и ЭТ тех же линий. Далее полученные клоны анализировали путем определения первичных последовательностей кло-

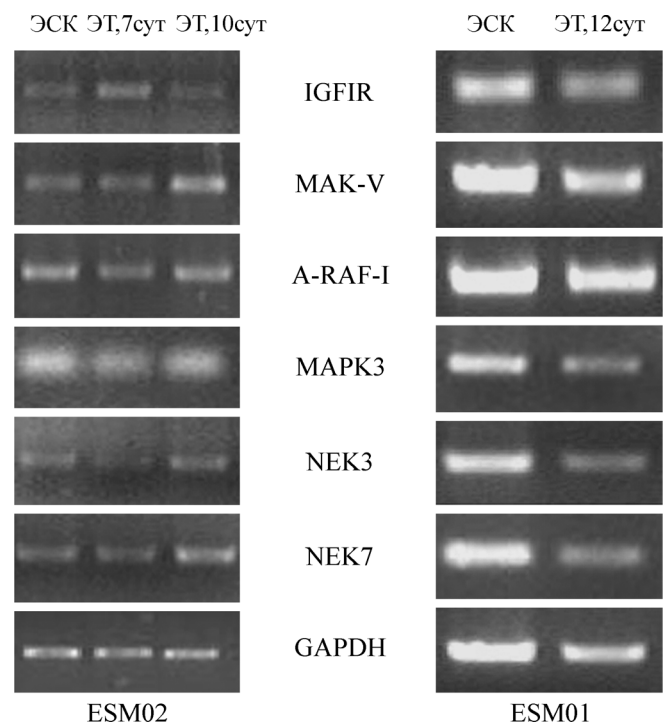


Рис. 2. Полуколичественный ОТ-ПЦР-анализ экспрессии протеинкиназ в ЭСК человека линий ESM01 и ESM02.

ЭТ — эмбрионные тельца, 7, 10 и 12-е сут культивирования. GAPDH использован как контроль количества матрицы для ПЦР.

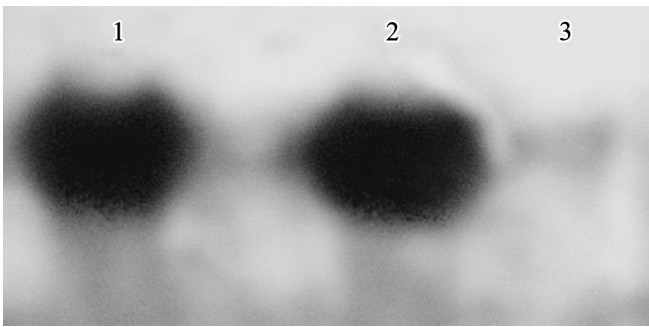


Рис. 3. Анализ экспрессии протеинкиназы MAK-V в ЭСК человека линии hESM01 (1), клетках тератокарциномы NTERA2A человека (2) и гепатоцитах человека (3). Радиоавтография.

нированных фрагментов, одновременно проводили истощение библиотек по наиболее часто повторяющимся транскриптам. Используя полученные библиотеки, мы проанализировали около 800 клонов, среди которых протеинкиназа MAK-V составила 43.6 % от общего числа клонов, MAPKAPK3 — 30.3, MAPKAPK — 23.5 %; 11.2 % клонов содержали кДНК, соответствующую рибонуклеопротеинам A3 и B, белкам unk50, hrRNPД, HDGF2 и PRP8, и фрагменты геномной ДНК. Другие протеинкиназы (NEK3, NEK7, RYK, A-RAF-1, IGF1R и PKC) были представлены единичными клонами. В результате секвенирования нам удалось идентифицировать 9 различных протеинкиназ.

Определение уровня экспрессии протеинкиназ. Для определения уровня экспрессии протеинкиназ нами был выбран метод полуколичественного ОТ-ПЦР-анализа. Для этого были подобраны праймеры, специфичные для каждой отдельно взятой протеинкиназы из библиотеки. Уровень экспрессии оценивали для недифференцированных ЭСК и ЭТ 12 сут культивирования линии hESM01 и для недифференцированных ЭСК и ЭТ 7 и 10 сут культивирования в суспензии линии hESM02.

Анализ линии hESM01, проведенный методом ОТ-ПЦР, показал практически равный уровень экспрессии MAK-V как в ЭСК, так и в ЭТ (рис. 2). Однако для линии hESM02 картина приобрела несколько иной характер: здесь можно наблюдать повышение уровня экспрессии протеинкиназы MAK-V в ЭТ 10 сут культивирования по сравнению с ЭСК и ЭТ 7 сут культивирования. Данным методом было выявлено увеличение уровня экспрессии IGF1R в ЭТ 7 сут культивирования по сравнению с ЭСК и ЭТ 10 сут культивирования для линии hESM02, для линии hESM01 такого изменения экспрессии мы не обнаружили. Мы наблюдали увеличение экспрессии NEK7 в ЭТ линии hESM02 10 сут культивирования по сравнению с ЭСК и ЭТ 7 сут культивирования, в другой линии изменения экспрессии не обнаружили. Уровень экспрессии протеинкиназ A-raf, MAPK3 и NEK3 не различался как в ЭСК, так и в ЭТ разного времени культивирования. Таким образом, мы проанализировали уровень экспрессии 6 протеинкиназ из библиотеки.

Для протеинкиназы MAK-V высокий уровень экспрессии в ЭСК был также подтвержден методом Норт-гибридизации (рис. 3).

Обсуждение

Линии ЭСК не являются идентичными, каждая из них кроме признаков, определяющих их как стволовые (плюрипотентность, способная к неограниченному количеству клеточных делений и высокая пролиферативная активность), имеет ряд отличий: разный уровень экспрессии ряда маркеров, количество спонтанно дифференцированных колоний при одних и тех же условиях культивирования и способность спонтанно дифференцироваться преимущественно по тому или иному пути. Несомненно, это может диктоваться различием в функционирующих внутри клетки сигнальных каскадах, и протеинкиназы играют в них существенную роль. Нами показано, что уровень экспрессии одних и тех же протеинкиназ различался у клеточных линий ЭСК. Протоонкоген A-raf характерен для всех сигнальных путей через поверхностные рецепторы факторов роста, в которых принимают участие RAS-белки. A-raf передает сигнал с RAS-белков через ряд этапов на MAPK. Уровень экспрессии данной протеинкиназы как в ЭСК, так и в ЭТ разного времени культивирования не различался, так же как MAPK3 (рис. 2). Наличие экспрессии всех компонентов MAPK-пути было детектировано в преимплантационных эмбрионах мыши (Wang et al., 2004). В ряде работ показано, что MAPK-путь регулирует митоз-специфичные семейства киназ, такие как полоподобные (polo-like) киназы (Okano-Uchida et al., 2001) и NEK-киназы (Di Agostina et al., 2002). NEK3 участвует в передаче сигнала через пролактиновый рецептор (Tanaka, Nigg, 1999; Miller et al., 2005), нами не было выявлено изменение уровня экспрессии этой протеинкиназы в процессе дифференцировки ЭСК (рис. 2). NEK7 принимает участие в сигнальном пути, регулирующем митоз (Kandli et al., 2000; Belham et al., 2003). Мы обнаружили увеличение экспрессии NEK7 в ЭТ линии hESM02 10 сут культивирования (рис. 2). Эти данные согласуются с данными о высокой экспрессии компонентов MAPK-пути и их мишеней (NEK) в преимплантационных эмбрионах мыши и косвенно подтверждают предполагаемую митотическую активность MAPK-киназ на этих стадиях, которая заключается в регуляции веретена деления. Это свойство MAPK-киназ распространяется на узкий круг линий клеток, эквивалентных ранним стадиям эмбриона, и не характерно для соматических клеток. Сигнальная система IGF высококонсервативна у всех позвоночных. Связывание лиганда с IGF1R ведет к активации двух главных сигнальных путей MAPK и PI3K/Atk-1 (Jones, Clemmons, 1995; Butler et al., 1998; Blume-Jensen, Hunter, 2001). IGF1 стимулирует созревание ооцитов и эмбриональное развитие у различных видов (Narula et al., 1996; Herrler et al., 1998; Moreira et al., 2002; Lin et al., 2003), включая человека (Lighten et al., 1998). Мыши, нокаутные по IGF1R, имели на 45 % меньшую массу, чем дикий тип, и умирали при рождении. У них наблюдались мышечная гипоксия, замедленное развитие кости и измененная морфология центральной нервной системы (Liu et al., 1993). Сигнальная система IGF — потенциальный нейрональный индуктор, она необходима для формирования головных структур у эмбрионов шпорцевой лягушки (Pera et al., 2001; Richard-Parpaillon et al., 2002). Исследования на полосатых данио показали, что отсутствие экспрессии IGF1R приводит к полной потере головы и глазных структур, отсутствию ното хорды и появлению абнормальных сомитов (Eivers et al., 2004). Что касается ран-

них этапов эмбрионального развития, то существуют данные, показывающие, что добавление IGF1 в среду для культивирования бластоцист увеличивает количество клеток внутренней клеточной массы у человека и крупного рогатого скота (Narula et al., 1996; Lighten et al., 1998). Наибольший уровень экспрессии IGF1R мы наблюдали в ЭТ 7 сут культивирования, а к 10-м сут культивирования его экспрессия ослабевает и становится практически равной уровню экспрессии в ЭСК (рис. 2). В одной из работ (Kim et al., 2005) продемонстрировано, что наибольший уровень экспрессии мРНК IGF1R в неоплодотворенной бластоцисте, в 2- и 4-клеточных эмбрионах, и он постепенно уменьшается на стадиях 8-клеточного эмбриона, морулы и бластоцисты. МАК-V — родственная MARK/Par-1/MELK протеинкиназа — ассоциирована с нейрональной дифференцировкой. МАК-V регулирует эндцитоз (Korobko et al., 2000), взаимодействуя с Rabaptin-5 (Korobko et al., 2000). Нозерн-гибридизация подтвердила высокий уровень экспрессии гена МАК-V ЭСК линии hESM01 — практически такой же, как для клеток человеческой тератокарциномы NTERA2A, в отличие от клеток печени, в которых она практически не детектируется (рис. 3). Анализ, проведенный методом ОТ-ПЦР, показал повышение уровня экспрессии данной протеинкиназы в ЭТ 10 сут культивирования по сравнению с ЭСК и ЭТ 7 сут культивирования для линии hESM02. Однако уровень экспрессии протеинкиназы падает в ЭТ линии hESM01 (рис. 2). Данные, полученные на эмбрионах шпорцевой лягушки, подтверждают высокий уровень экспрессии МАК-V как в неоплодотворенных ооцитах, так и на ранних стадиях развития эмбриона. На стадии гастрюлы экспрессия МАК-V ограничивается эктодермой, на поздних стадиях развития эмбриона — районом нервной пластинки, а еще позже — только районом нервной трубки (Ruzov et al., 2004).

Так как линии ЭСК обладают разным приоритетом в направлении дифференцировки, можно предположить, что даже незначительные различия в экспрессии генов протеинкиназ коррелируют с предпочтительным направлением дифференцировки ЭСК.

Список литературы

- Belham C., Roig J., Caldwell J. A., Aoyama Y., Kemp B. E., Comb M., Avruch J. 2003. A mitotic cascade of NIMA family kinases. Ncc1/Nek9 activates the Nek6 and Nek7 kinases. *J. Biol. Chem.* 278 : 34 897—34 909.
- Blume-Jensen P., Hunter T. 2001. Oncogenic kinase signaling. *Nature.* 411 : 355—365.
- Butler A. A., Yakar S., Gewolb I. H., Karas M., Okubo Y., Leroith D. 1998. Insulin-like growth factor-1 receptor signal transduction: at the interface between physiology and cell biology. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 121 : 19—26.
- Di Agostino S., Rossi P., Geremia R., Sette C. 2002. The MAPK pathway triggers activation of Nek2 during chromosome condensation in mouse spermatocytes. *Development* 129 : 1715—1727.
- Eivers E., McCarthy K., Glynn C., Nolan C. M., Byrnes L. 2004. Insulin-like growth factor (IGF) signaling is required for early dorso-anterior development of the zebrafish embryo. *Int. J. Develop. Biol.* 48 : 1131—1140.
- Evans M. J., Kaufman M. 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature.* 292 : 154—156.
- Hardie G., Hanks S. 1995. The Protein Kinase FactsBook: Protein-Serine Kinases. San Diego, CA: Acad. Press. 418 p.
- Herrler A., Krusche C. A., Beier H. M. 1998. Insulin and insulin-like growth factor-1 promote rabbit blastocyst development and prevent apoptosis. *Biol. Reprod.* 59 : 1302—1310.
- Jones J. I., Clemmons D. R. 1995. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocrinol. Rev.* 16 : 3—34.
- Kandli M., Feige E., Chen A., Kilfin G., Motro B. 2000. Isolation and characterization of two evolutionarily conserved murine kinases (Nek6 and nek7) related to the fungal mitotic regulator, NIMA. *Genomics.* 68 : 187—196.
- Kim S., Lee G. S., Lee S. H., Kim H. S., Jeong Y. W., Kim J. H., Kang S. K., Lee B. C., Hwang W. S. 2005. Embryotropic effect of insulin-like growth factor (IGF)-1 and its receptor on development of porcine preimplantation embryos produced by *in vitro* fertilization and somatic cell nuclear transfer. *Mol. Reprod. Develop.* 72 : 88—97.
- Kishimoto T. 2003. Distinct regulators for Plk1 activation in starfish meiotic and early embryonic cycles. *EMBO J.* 22 : 5633—5642.
- Korobko E. V., Smirnova E. V., Kiselev S. L., Georgiev G. P., Korobko I. V. 2000. Identification of a new alternative-splicing transcript of Rabaptin-5 interacting with protein kinase MAK-V. *Dokl. Biochem.* 370 : 1—3.
- Korobko I. V., Korobko E. V., Kiselev S. L. 2000. The MAK-V protein kinase regulates endocytosis in mouse. *Mol. Gen. Genet.* 264 : 411—418.
- Lagarkova M. A., Volchkov P. Y., Lyakisheva A. V., Philonenko E. S., Kiselev S. L. 2006. Diverse epigenetic profile of novel human embryonic stem cell lines. *Cell Cycle.* 5 : 416—420.
- Lighten A. D., Moore G. E., Winston R. M., Hardy K. 1998. Routine addition of human insulin-like growth factor-1 ligand could benefit clinical *in vitro* fertilization culture. *Hum. Reprod.* 13 : 3144—3150.
- Lin T. C., Yen J. M., Gong K. B., Hsu T. T., Chen L. R. 2003. IGF-1/IGFBP-1 increases blastocyst formation and total blastocyst cell number in mouse embryo culture and facilitates the establishment of a stem-cell line. *BMC Cell Biol.* 19 : 14—28.
- Liu J. P., Baker J., Perkins A. S., Robertson E. J., Efstratiadis A. 1993. Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor 1 (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r). *Cell.* 75 : 59—72.
- Martin G. R. 1981. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 78 : 7634—7638.
- Miller S. L., DeMaria J. E., Freier D. O., Riegel A. M., Cleveland C. V. 2005. Novel association of Vav2 and Nek3 modulates signaling through the human prolactin receptor. *Mol. Endocrinol.* 19 : 939—949.
- Minoguchi S., Minoguchi M., Yoshimura A. 2003. Differential control of the NIMA-related kinases, Nek6 and Nek7, by serum stimulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 301 : 899—906.
- Moreira F., Paula-Lopes F. F., Hansen P. J., Badinga L., Thatcher W. W. 2002. Effects of growth hormone and insulin-like growth factor-1 on development of *in vitro* derived bovine embryos. *Theriogenology.* 57 : 895—907.
- Narula A., Taneja M., Totey S. M. 1996. Morphological development, cell number, and allocation of cells to trophoblast and inner cell mass of *in vitro* fertilized and parthenogenetically developed buffalo embryos: the effect of IGF-1. *Mol. Reprod. Develop.* 44 : 343—351.
- Okano-Uchida T., Okumura E., Iwashita M., Yoshida H., Tachibana K., Pera E. M., Wessely O., Li S. Y., De Robertis E. M. 2001. Neural and head induction by insulin-like growth factor signals. *Develop. Cell.* 1 : 655—665.
- Reubinoff B. E., Pera M. F., Fong C. Y., Trounson A., Bongso A. 2000. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation *in vitro*. *Nat. Biotechnol.* 18 : 399—404.
- Richard-Parpaillon L., Heligon C., Chesnel F., Boujard D., Philpott A. 2002. The IGF pathway regulates head formation by inhibiting Wnt signaling in *Xenopus*. *Develop. Biol.* 244 : 407—417.
- Ruzov A. S., Mertsalov I. B., Meehan R., Kiselev S. L., Buchman V. L., Korobko I. V. 2004. Cloning and developmental expres-

sion of MAPK/Par-1/MELK-related protein kinase xMAK-V in *Xenopus laevis*. *Develop. Genes Evol.* 214 : 139—143.

Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. 1989a. Extraction and purification of plasmid DNA. In: *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Lab. Press. 1.21—1.53.

Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. 1989b. Identification and analysis of recombinants. In: *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Lab. Press. 2.108—2.122.

Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. 1989c. Analysis of RNA. In: *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Lab. Press. 7.37—7.84.

Tanaka K., Nigg E. A. 1999. Cloning and characterization of the murine Nek3 protein kinase, a novel member of the NIMA fa-

mily of putative cell cycle regulators. *J. Biol. Chem.* 274 : 13 491—13 497.

Thomson J. A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S. S., Waknitz M. A., Swiergiel J. J., Marshall V. S., Jones J. M. 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science.* 282 : 1145—1147.

Wang Y., Wang F., Sun T., Barisic D., Trostinskaia A., Wyg-
le D., Puscheck E., Rappolee D. A. 2004. Entire mutagen activated protein kinase (MAPK) pathway is present in preimplantation mouse embryos. *Develop. Dynamics.* 231 : 72—87.

Wilks A. F. 1989. Two putative protein-tyrosine kinases identified by application of the polymerase chain reaction. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 86 : 1603—1607.

Поступила 13 VI 2006

PROTEIN KINASES ABUNDANTLY EXPRESSED IN UNDIFFERENTIATED HUMAN ESC LINES AND DERIVED EMBRYOID BODIES

E. S. Filonenko, P. Yu. Volchkov, I. A. Mufazalov, S. L. Kiselev, M. A. Lagarkova¹

Institute of Gene Biology RAS, Moscow; ¹ e-mail: maryalag@yahoo.com

The ability of human embryonic stem cells (ESCs) to unlimited proliferation and huge differentiation potential makes them very attractive tool both for basic research and biological medicine. There are still little known about mechanisms that govern their differentiation or keep them in a pluripotency state. A variety of signaling events determines gene expression profiles responsible for such mechanisms activation. Protein kinases are key components of the signaling cascades. The knowledge about protein kinases expression profile in undifferentiated ESCs and embryoid bodies (EBs) will allow to understand early differentiation events. We constructed cDNA libraries containing fragments of protein kinases catalytic domain that were expressed in undifferentiated cells or EB of hESM01, hESM02 cell lines. We detected high level of MAK-V expression using Northern-blot hybridization. Semi-quantitative RT-PCR was used to compare the level of abundantly expressed kinases MAK-V, A-RAF-1, MARK3, IGF1R, NEK3 and NEK7 in undifferentiated ESCs or derived EBs.