

РОЛЬ STAT5 В ПРОЛИФЕРАЦИИ КУЛЬТУР КЛЕТОК ХРОНИЧЕСКОЙ ЛЕЙКЕМИИ K562: АНАЛИЗ ИНГИБИРУЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ WHI-P131

© Е. В. Митюшова, Н. Д. Аксенов, И. И. Марахова¹

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;

¹ *электронный адрес: iim@mail.cytspb.rssi.ru*

Охарактеризована роль JAK/STAT сигнального пути в пролиферации клеток хронической лейкемии K562. Активность белков семейства STAT (транскрипционных факторов) оценивали по количеству фосфорилированных по тирозину форм STAT3 и STAT5. В пролиферирующих культурах клеток K562 выявлен высокий уровень фосфорилирования STAT3 и STAT5. Для выяснения роли этих белков в поддержании пролиферативного статуса культуры K562 использовали ингибиторы JAK/STAT-пути: AG-490, ингибирующий киназу JAK2 и JAK3 в разных клетках, и WHI-P131 — ингибитор, специфичный для киназы JAK3. Установлено, что длительное (48 ч) ведение клеточных культур в присутствии использованных ингибиторов не сопровождается гибелью клеток. Обнаружено, что WHI-P131 снижает уровень фосфорилирования STAT5 (но не STAT3) и останавливает рост культур K562. Цитометрический анализ распределения клеток по фазам клеточного цикла в культуре K562, растущей в присутствии WHI-P131 (30—100 мкМ), показал дозозависимое снижение доли клеток в фазах G₁ и S и отсутствие существенных изменений в структуре клеточного цикла при наличии в среде культивирования AG-490 (25—50 мкМ). Полученные данные указывают на ключевую роль STAT5 в поддержании пролиферативного статуса клеток K562 и выявляют специфику ингибирующего действия WHI-P131: в отличие от других, ранее испытанных ингибиторов киназ семейства JAK, которые стимулируют апоптотическую гибель клеток, WHI-P131 останавливает клеточный рост, задерживая клетки на границе постсинтетических фаз G₂/M клеточного цикла.

Ключевые слова: JAK/STAT-сигнализация, STAT3, STAT5, WHI-P131, AG-490, пролиферация, клетки K562.

Принятые сокращения: ИЛ-2 — интерлейкин-2, ЛПК — лимфоциты периферической крови, JAK — Janus kinase, STAT — signal transducers and activators of transcription.

При запуске иммунного и пролиферативного ответов лимфоцитов периферической крови (ЛПК) человека используются практически все известные сигнальные молекулы и сигнальные каскады. Общеизвестно, что ключевым компонентом системы сигнализации с рецепторов цитокинов является JAK/STAT-путь. В нормальных Т-лимфоцитах передача сигнала с участием двух представителей семейства белков STAT (signal transducer and activator of transcription) — STAT3 и STAT5 — характерна только для интерлейкин-2 (ИЛ-2)-зависимой стадии активации, тогда как на первой, антигензависимой, стадии ответа ЛПК (когда «включается» Т-клеточный рецептор) белки STAT для сигнализации не используются (Berridge, 1997; Leonard, Lin, 2000; Lin, Leonard, 2000). Оптимальная активность нерецепторных тирозинкиназ семейства JANUS (JAK) и транскрипционных факторов STAT является необходимым условием успешной передачи пролиферативного сигнала при взаимодействии цитокинов (в частности, ИЛ-2) с рецептором плазматической мембраны. Неудивительно, что нарушение функционирования этого пути лежит в основе различных заболеваний, таких как лейкемия, лимфомы, иммунодефицит (Kirken et al., 2000; Leonard, 2001; Yamaoka et al., 2004; Khwaja, 2006).

В трансформированных лимфоидных клетках белки STAT (преимущественно STAT3 и STAT5) находятся в гиперактивном состоянии (Turkson, Jove, 2000; Tong et al., 2008). Эти транскрипционные факторы участвуют в онкогенезе, активируя экспрессию генов, которые контролируют клеточный цикл, а также генов, регулирующих апоптоз и выживание клеток (Darnell, 1997; Alvarez, Frank, 2004). Высокий уровень активности белков STAT является диагностическим маркером лейкемий разного вида, а сами компоненты JAK/STAT-пути рассматриваются в качестве перспективных терапевтических мишеней при разработке подходов для лечения аутоиммунных заболеваний и лейкозов (Pesu et al., 2005; Ferrajoli et al., 2007; Kim et al., 2008; Lewis, Ward, 2008; Ozawa et al., 2008). Вместе с тем механизмы, контролируемые гиперактивностью JAK/STAT-пути в опухолевых клетках, изучены недостаточно. Трудность подобных исследований состоит в том, что в клетках разных опухолей и разных линий, полученных на основе опухоли одного вида, выявляются разные генные мишени белков STAT, и пока не удается выявить общие, универсальные признаки в нарушении JAK/STAT-сигнализации, которые неизбежно приводят к трансформации клеток. В этой связи информативным является тестирование адекватных биологических

систем (такowymi, в частности, могут быть клетки постоянных линий), для того чтобы составить детальную картину регуляции JAK/STAT-пути внутриклеточной сигнализации в связи с действием цитокинов и трансформирующих факторов.

Цель настоящей работы — охарактеризовать роль белков STAT в поддержании высокого пролиферативного статуса постоянных линий хронической лейкемии K562. Для этого оценивали уровень фосфорилирования STAT3 и STAT5 в растущих культурах этих клеток и изучали влияние фармакологических ингибиторов тирозинкиназ JAK на состояние белков STAT, уровень пролиферации и распределение клеток по фазам клеточного цикла, а также на внутриклеточное содержание моновалентных катионов, постоянство которого является показателем жизнеспособности клеток. Клетки K562 широко используются в лабораторных работах и могут служить модельной системой для сравнительного анализа специфики внутриклеточной сигнализации в трансформированных лимфоидных клетках и нормальных лимфоцитах человека.

Материал и методика

Культивирование клеток. Клетки линии K562 (хроническая лейкемия человека) культивировали в среде RPMI с 10 % эмбриональной сыворотки («Пан-Эко»). Клетки пересевали из расчета 300 тыс./мл по мере роста культуры, обычно 3 раза в 1 нед, и культивировали до плотности 1 млн/мл.

Обработка ингибиторами. Ингибиторы киназ семейства JAK тирфостины WHI-P131 и AG-490 вносили в среду на 2-е сут после посева культуры. Далее через 24—48 ч обработанные ингибиторами культуры брали в опыт для параллельных измерений активности белков STAT (оцениваемой по содержанию фосфорилированных форм соответствующих белков), уровня пролиферации, а также внутриклеточного ионного состава.

Получение тотальных клеточных лизатов. Для получения лизатов клетки осаждали центрифугированием при 1000 об/мин в течение 3 мин, осадки промывали 3 раза холодным буферным раствором PBS и лизировали на льду 20 мин в лизирующем буфере, содержащем 50 мМ Tris-HCl, pH 7.4, 1 % Тритона X-100, 0.5 % но니다та Р-40 (NP-40), 0.5 % дезоксихолата, 150 мМ NaCl, по 1 мМ EDTA, EGTA и PMSF, 1 мкг/мл коктейля ингибиторов фосфатаз, по 1 мМ Na₃VO₄ и NaF. Полученную смесь центрифугировали при 15 000 g в течение 15 мин при 4 °С. Супернатант отбирали, 1—2 мкл брали для определения концентрации белка в пробе. К остальному супернатанту добавляли 5-кратный буфер Лэммли для электрофоретических проб (40 мМ Tris-HCl, pH 6.8, 20 % SDS, 20 % β-меркаптоэтанола и 40 % глицерина). Количество общего белка в пробе оценивали по методу Бредфорд (Bradford, 1976). В качестве стандарта для калибровочной кривой использовали овальбумин.

Антитела. Поликлональные антитела против STAT3, фосфорилированного по тирозину 705, и STAT5 (STAT5A/B), фосфорилированного по тирозину 694 (Cell signaling technology, США), разводили (1:1000) в 5%-ном растворе бычьего сывороточного альбумина (BSA), приготовленном на 0.1%-ном TTBS. В качестве вторичных использовали поликлональные конъюгированные с пероксидазой хрена козы антитела, полученные против иммуноглобулинов кролика — GAR-HRP (Cell signaling,

США), приготовленные на 5%-ном обезжиренном молоке в разведении 1 : 6000. Моноклональные антитела против нефосфорилированного STAT3 (Transduction laboratories, США) и вторичные антитела GAM-HRP готовили на обезжиренном 5%-ном молоке в разведениях 1 : 1000 и 1 : 20 000 соответственно. Поликлональные антитела против нефосфорилированного STAT5 (Cell signaling technology, США) разводили (1 : 1000) 5%-ным раствором BSA в 0.1%-ном TTBS. В качестве вторичных использовали конъюгированные с пероксидазой хрена козы антитела, полученные против иммуноглобулинов кролика — GAR-HRP (Cell signaling, США), приготовленные на 5%-ном обезжиренном молоке в разведении 1 : 5000.

Электрофорез и иммуноблотинг. Электрофоретическое разделение белков проводили методом диск-электрофореза в 7.5%-ном полиакриламидном геле в присутствии SDS с последующим полусухим электропереносом (0.8 мА/см², 1 ч 15 мин) на нитроцеллюлозную мембрану (Hybond-C Extra, Amersham Pharmacia Biotech, Швеция). Визуализацию блотов проводили путем усиленной хемилюминесценции (ECL). Хемилюминесцентное свечение регистрировали при экспонировании мембраны на пленку для рентгеновских снимков Fujifilm Super RX. Пленку сканировали с помощью сканера ARCUS 11 (AGFA) для оценки относительных изменений плотности проявленных полос. Для оценки равномерности нанесения проб на гель после окраски антителами против фосфорилированных форм белков STAT мембрану инкубировали в специальном буфере для удаления антител (62.5 мМ Tris-HCl, pH 6.8, 2 % SDS, 100 мМ β-меркаптоэтанола) в течение 40 мин при 50 °С и подвергали повторной окраске с антителами против нефосфорилированного STAT3.

Измерение внутриклеточного содержания калия и натрия. Для оценки функционального состояния клеток измеряли содержание моновалентных катионов с помощью метода пламенно-эмиссионной фотометрии (Веренинов и др., 1982). Суспензию клеток (1 мл) помещали в пробирки Эппендорф, центрифугировали при 600 g 3—5 мин и осадок пятикратно промывали охлажденным раствором MgCl₂ (85 мМ), не ресуспендируя, и заливали 1 мл 5%-ной трихлоруксусной кислоты. Содержание катионов в надосадочной жидкости определяли на атомно-абсорбционном фотометре Perkin-Elmer AA-306. Далее осадок растворяли в 1 мл 0.1 н. NaOH для последующего определения содержания общего белка по методу Лоури. Концентрацию катионов выражали в мкмольях на 1 мг общего белка.

Для оценки уровня пролиферации активированных лимфоцитов использовали метод проточной ДНК-цитометрии. Перед измерением клетки инкубировали 30 мин в PBS, содержащем 0.02 % сапонина, и после трехкратного отмывания от сапонина при помощи PBS клетки окрашивали в течение 30—40 мин при 37 °С в PBS, содержащем 50 мкг/мл иодида пропидия и 250 мкг/мл рибонуклеазы. Анализ распределения клеток по фазам клеточного цикла проводили на двухлазерном проточном цитометре-сортировщике ATC 3000 (Brucker, Германия) при скорости анализа 1000 клеток в 1 с.

Результаты и обсуждение

На рис. 1 приведены типичные иммуноблоты тотальных лизатов клеток K562, из которых следует, что в пролиферирующих культурах клеток хронической лейкемии

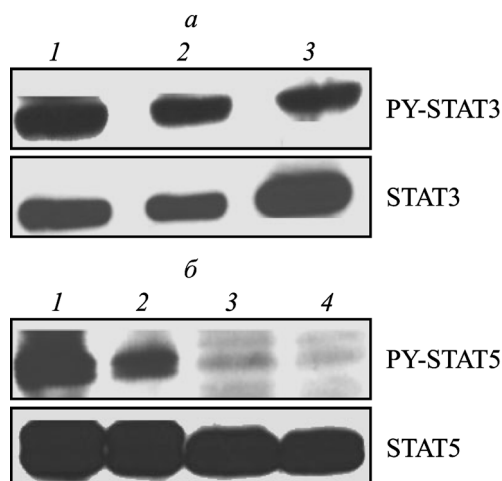


Рис. 1. Сравнение уровней фосфорилирования белков STAT3 и STAT5 в пролиферирующих культурах клеток хронической лейкемии K562 и Т-клеток Jurkat.

Иммуноблоты тотальных лизатов клеток K562 и Jurkat, окрашенных против PY-STAT3 и STAT3 (а) и против PY-STAT5 и STAT5 (б). 1 — K562, контроль; 2 — K562 + WHI-P131 (30 мкМ, а или 75 мкМ, б); 3 — Jurkat, контроль; 4 — Jurkat + WHI-P131 (75 мкМ). Здесь и на рис. 2, 3 приведены иммуноблоты, окрашенные антителами против STAT5 (PY-STAT5), фосфорилированного по тирозину 694, и STAT3 (PY-STAT3), фосфорилированного по тирозину 705. Для оценки равномерности нанесения лизатов мембрану инкубировали в специальном буфере для удаления антител и подвергали повторной окраске с антителами против STAT5 или STAT3.

K562 отмечается высокий уровень фосфорилирования по тирозину белков STAT3 и STAT5. Для сравнения на рисунке приведены иммуноблоты лизатов Т-клеток линии Jurkat, из которых следует, что в отличие от клеток K562 в пролиферирующих клетках Jurkat фосфорилированные формы белков STAT5 практически не детектируются, но так же как и в клетках K562, отмечается высокий уровень фосфорилирования STAT3.

Для выяснения роли белков STAT в поддержании пролиферации клеток K562 провели ингибиторный анализ. Известно, что специфические ингибиторы тирозинкиназ семейства JAK выключают фосфорилирование самих киназ и соответственно фосфорилирование белков STAT. В работе использовали два ингибитора: тирфостин AG-490 и WHI-P131. AG-490, по данным литературы, специфичен для киназы JAK2 в разных клетках, а также ингибирует киназу JAK3 в таких широко используемых в исследованиях Т-клеточных линиях, как CTLL-2 и D10 (Wang et al., 1999). Ингибитор WHI-P131 специфичен только к киназе JAK3 (Sudbeck et al., 1999).

На рис. 2 представлены данные 1 репрезентативного эксперимента из 6 повторяющихся и проведенных по одной схеме. Культуры клеток K562 после посева с плотностью 0.3 млн/мл вели в течение 1 сут в среде RPMI с сывороткой, а затем добавляли соответствующий ингибитор киназы JAK и продолжали инкубирование еще в течение 2 сут. К концу инкубации с ингибиторами анализировали наличие фосфорилированных и нефосфорилированных форм белков STAT. Рис. 2 показывает, что WHI-P131 снижает содержание фосфорилированных форм белков STAT5 в клетках K562 и не оказывает заметного влияния на уровень фосфорилирования STAT3. Следует отметить, что в присутствии высоких (более 100 мкМ) концентраций WHI-P131, которые, как правило, не использовали в работе, в 2 опытах из 5 отмечали незначительное умень-

шение содержания фосфорилированных форм белка STAT3 (данные не показаны). Ингибирующее влияние WHI-P131 на фосфорилирование STAT5 зависит от концентрации: увеличение концентрации ингибитора с 30 до 100 мкМ почти полностью подавляет фосфорилирование STAT5 в клетках K562 (рис. 1 и 2). Другой ингибитор — AG-490, который имеет более широкий спектр действия в отношении киназ JAK (Wang et al., 1999), в концентрации 50—100 мкМ практически не влиял на уровень фосфорилирования и STAT3, и STAT5 в клетках K562 (рис. 3).

Длительное (до 2 сут) ведение клеточных культур в присутствии испытанных ингибиторов тирозинкиназ JAK не сопровождается гибелью клеток. Об этом свидетельствуют результаты экспериментов, проведенных с целью выявить, изменяется ли содержание главных однозарядных катионов в клетках. По нашим данным, через 48 ч после добавления в растущую культуру K562 WHI-P131 в концентрациях, которые снижают содержание фосфорилированных форм белков STAT5, в клетках поддерживается высокое отношение содержания моновалентных катионов (калия к натрию) и сохраняются высокими входные потоки рубидия, который является аналогом калия в системах активного транспорта ионов через мембрану (см. таблицу). Из этих данных следует, что обработанные ингибиторами WHI-P131 клетки K562, в которых практически выключен JAK3/STAT5-путь сигнализации, останавливают рост, но сохраняют высокий ионный гомеостаз и являются функционально жизнеспособными.

Для ответа на вопрос о том, изменяется ли пролиферативный статус культур клеток K562 при ингибировании активности STAT5, провели анализ изменений распределения клеток по фазам клеточного цикла по мере роста культур в присутствии WHI-P131. На рис. 4 представлены

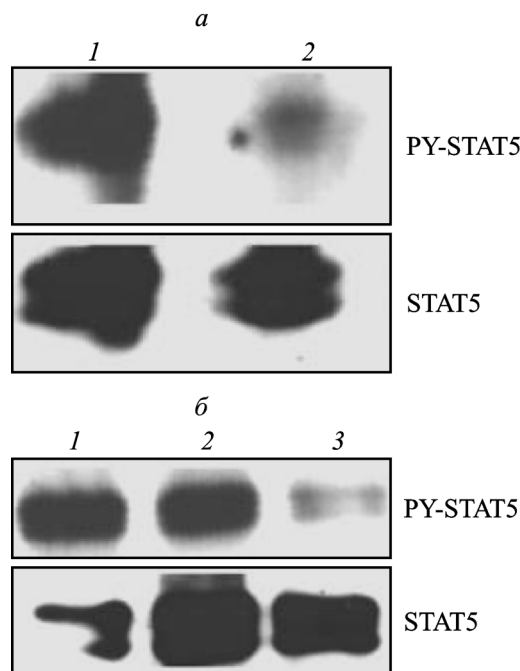


Рис. 2. Подавление фосфорилирования STAT5 ингибитором тирозинкиназы JAK3 (WHI-P131) в клетках хронической лейкемии K562.

а, б — иммуноблоты тотальных лизатов клеток K562, окрашенных против PY-STAT5, в двух независимых экспериментах; дорожки: 1 — контроль, 2 — с добавлением WHI-P131 в концентрации 100 (а), 50 (б) или 75 (б, 3) мкМ.

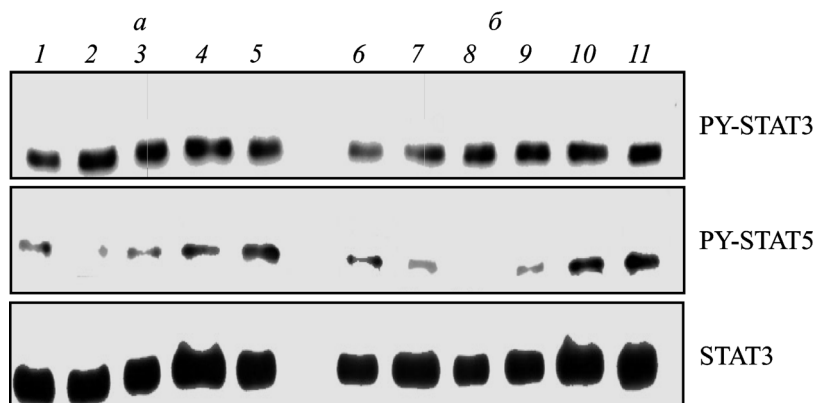


Рис. 3. Изменение уровня фосфорилирования STAT3 и STAT5 в клетках K562 при действии двух ингибиторов JAK-киназ — WHI-P131 и AG-490.

a, б — две независимые электрофореграммы на клеточных лизатах 1 репрезентативного опыта из 6. 1, 6, 7 — растущие культуры клеток K562 без ингибиторов (контроль); 2, 8 — то же в присутствии WHI-P131, 100 мкМ; 3, 9 — то же в присутствии WHI-P131, 50 мкМ; 4, 10 — то же в присутствии AG-490, 100 мкМ; 5, 11 — то же в присутствии AG-490, 50 мкМ.

данные 1 эксперимента (из 5), в котором параллельно с оценками уровня фосфорилирования белков STAT проводили цитометрический анализ распределения клеток по фазам клеточного цикла культур одного посева — контрольных (без ингибиторов) и опытных, которые вели в течение 2 сут в присутствии WHI-P131 в разных концентрациях (30, 50 и 75 мкМ). Можно видеть, что по мере увеличения концентрации ингибитора от 30 (рис. 3, *б*) до 75 (рис. 4, *з*) мкМ гистограммы претерпевают характерные изменения, свидетельствующие о накоплении клеток в постсинтетических фазах клеточного цикла M и G₂ без существенного изменения числа клеток в фазе синтеза ДНК (фазе S). Примечательно, что одновременно снижается число клеток в предсинтетической фазе цикла G₁. Такой характер изменения ДНК-гистограмм свидетельствует о возникновении блока клеточного цикла на границе фаз G₂/M после синтеза ДНК. В отличие от WHI-P131 менее специфичный к JAK3 ингибитор AG-490, который не влиял на уровень фосфорилирования белков STAT в клетках K562, не вызывал существенных изменений и в характере ДНК-гистограмм (данные не показаны).

Изменения в структуре клеточного цикла согласуются с данными, которые свидетельствуют о замедлении и остановке роста клеточных культур в присутствии WHI-P131. Как правило, на 4-е сут после посева клеток K562 с начальной плотностью 0.3 млн/мл в контрольных культурах, которые вели без WHI-P131, плотность клеток составляла не менее 1 млн/мл, тогда как в присутствии WHI-P131 (в течение 2-х последних сут культивирования)

плотность клеток не превышала 0.5—0.6 млн/мл. Следует отметить, что остановка роста культур клеток K562, вызванная присутствием WHI-P131, является обратимой (данные не показаны).

Таким образом, полученные данные указывают на ключевую роль STAT5 в поддержании высокого пролиферативного статуса клеток лейкемии K562. Изменение структуры клеточного цикла, зарегистрированное методом проточной ДНК-цитометрии, позволяет сделать вывод о том, что WHI-P131 вызывает остановку пролиферации и клеточного роста, задерживая клетки K562 на границе постсинтетических фаз G₂/M клеточного цикла.

В литературе сложилось представление о том, что при развитии разных заболеваний крови в лимфоидных клетках повышается уровень активности сигнального пути JAK/STAT. Обнаружено, что гиперактивность тирозинкиназ семейства JAK коррелирует с неограниченным размножением клеток и опухолевым ростом, и, напротив, ослабление или потеря функциональной активности JAK сопутствует развитию иммунодефицита (Rane, Reddy, 2000). В нормальных лимфоцитах для адекватной передачи сигнала с рецепторов цитокинов необходим оптимальный уровень активности тирозинкиназы JAK.

Так, в клетках лимфомы ALCL обнаружен высокий уровень фосфорилирования STAT3 и JAK3 (Amin et al., 2003, 2004). В этих клетках подавление активности JAK3 ингибиторами снижало уровень фосфорилирования STAT3, что коррелировало с индукцией апоптоза и снижением числа клеток в фазе синтеза ДНК, а следствием

Содержание калия и натрия и входные потоки рубидия в клетках K562, культивируемых в среде RPMI с сывороткой в отсутствие и в присутствии WHI-P131

Условия культивирования	Входной поток Rb, мкмоль на 1 г за 30 мин	Содержание катионов, мкмоль на 1 г общего белка		Отношение (K+Rb)/Na	Плотность культуры, млн/мл
		натрий	калий		
RPMI+10 % сыворотки	71.9 ± 4.1	58.0 ± 2.8	552 ± 19	9.5	1.0
То же + WHI-P131	61.2 ± 3.2	60.0 ± 6.1	636 ± 36	10.6	0.6

Примечание. Данные по содержанию катионов в контроле (RPMI, содержащая 10 % сыворотки) приведены на 3-и сут культивирования. WHI-P131 (75 мкМ) вносили в среду на 2-е сут после посева культуры и клетки брали для измерений внутриклеточного содержания катионов одновременно с контрольными. Приведены средние из измерений в 3 опытах.

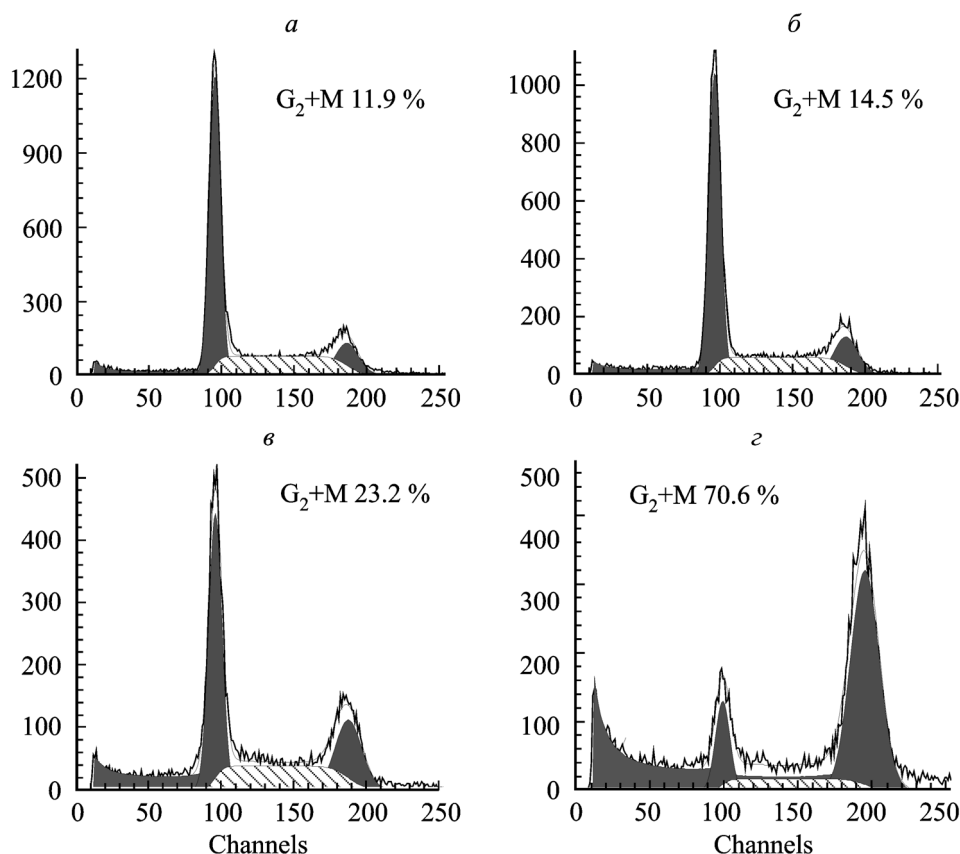


Рис. 4. Изменения в распределении клеток по фазам клеточного цикла при культивировании в течение 48 ч клеток K562 в присутствии разных концентраций WHI-P131. Данные 1 репрезентативного эксперимента из 5, выполненных по одной схеме.

a — контроль, клетки без ингибитора; *б* — в присутствии 30 мкМ WHI-P131, *в* — то же в присутствии 50 мкМ WHI-P131; *г* — то же в присутствии 75 мкМ WHI-P131. Суммарные значения численности клеток в фазах G₂ и M, выраженные в %, приведены над соответствующими гистограммами.

мутаций, приводящих к дефициту по STAT3, была остановка в фазе G₁ клеточного цикла. Таким образом, подавление конститутивной гиперактивности JAK3 и как следствие высокой активности STAT3 приводит к торможению роста опухолей. Действительно, конститутивная сигнализация через STAT3 способствует экспрессии таких регуляторов нормального клеточного роста и апоптоза, как циклин D1, c-Myc и Bcl-x (Turkson, Jove, 2000).

В клеточных линиях, полученных на основе классической лимфомы Ходжкина (сНЛ) и изученных наиболее систематично, обнаружен высокий уровень фосфорилирования ряда белков семейства STAT (1, 3, 5 и 6), которые выполняют разные функции в клетке (Cochet et al., 2006). Установлено, что клетки сНЛ секретируют различные цитокины (ИЛ-6 и ИЛ-13), вызывающие конститутивную активацию сигнального пути JAK/STAT. Обнаружено, что в этих клетках тирфостин AG-490, ингибитор тирозинкиназы JAK2, снижает уровень фосфорилирования и ДНК-связывающую активность STAT3, замедляя одновременно рост культуры клеток сНЛ (Kube et al., 2001; Baus, Pfitzner, 2006). Подавление экспрессии STAT3 с помощью специфичной для STAT3 siRNA также снижает уровень пролиферации в культурах клеток сНЛ (Baus, Pfitzner, 2006). Именно результаты изучения особенностей пролиферации клеточных линий лимфомы Ходжкина позволили сформулировать наиболее общий вывод о том, что среди других представителей семейства STAT STAT3 играет ключевую роль в трансформации и онкогенезе, предотвращая апоптотическую гибель клеток и спо-

собствуя пролиферации и трансформации клеток (Amin et al., 2004).

Несмотря на то что сделанный вывод о первостепенной роли STAT3 в поддержании неограниченного роста лимфоидных клеток подкреплен многими данными, которые получены как на клетках опухолей, так и на постоянных клеточных линиях, встречаются исследования, показывающие участие других представителей семейства STAT в поддержании высокого уровня пролиферации. В интерлейкинзависимой клеточной линии YТ, которая, как и линия ALCL, была получена из лимфобластной лимфомы человека, обнаружен высокий уровень активности не только STAT3, но и STAT5, и, что интересно, остановка роста культуры клеток YТ индуцируется по разным каналам в зависимости от того, сопряжена ли она с дефицитом STAT5 или STAT3 (Nagy et al., 2006). По результатам анализа экспрессии генов в клетках YТ, дефицитных по белкам STAT, сделан вывод о том, что STAT5 (а не STAT3) следует считать терапевтической мишенью, выключение которой должно приводить к остановке опухолевого роста.

Обнаружено, что в некоторых клеточных линиях сНЛ не удалось выключить экспрессию STAT3 с помощью siRNA, и в клетках, трансфицированных siRNA, специфичной к STAT3, сохранялось высокое содержание активных форм STAT3. Оказалось, что в этих случаях наблюдается гиперэкспрессия белков SOCS1 и SOCS3 (Baus, Pfitzner, 2006). Известно, что сигнализация с участием JAK/STAT-пути в нормальных клетках регулирует-

ся через белки семейства SOCS (suppressors of cytokine signaling), активность которых в свою очередь контролируется на уровне транскрипции через белки STAT: белки SOCS тормозят тирозинкиназную активность JAK и способствуют деградации JAK по протеосомному пути (Alexander, Hilton, 2004). Экспрессия белков SOCS должна строго контролироваться, чтобы не подавлять сигнализацию через JAK, «нужную» для активации нормальных клеток.

Таким образом, хотя в подавляющем большинстве известных случаев STAT3 играет решающую роль в трансформации клеток лимфоидной системы, в разных клеточных линиях могут оказаться гиперактивными разные белки семейства STAT, и к тому же могут функционировать разные механизмы, регулирующие активность сигнального пути JAK/STAT. Исходя из этих данных стратегия противоопухолевого лечения должна рассматривать разные мишени для терапевтического вмешательства. Полученные в работе данные указывают на участие белков STAT5 в поддержании роста культур клеток хронической лейкемии K562 и могут представлять интерес для анализа механизмов подавления роста опухолевых клеток лекарственными препаратами, которые взаимодействуют с компонентами сигнального пути JAK3/STAT5. Результаты проведенного исследования выявляют специфику ингибирующего действия WHI-P131: в отличие от других ранее испытанных ингибиторов киназ семейства JAK, которые стимулируют апоптотическую гибель клеток, WHI-P131 останавливает клеточный рост, задерживая клетки в постсинтетических фазах G₂/M клеточного цикла. Выявленные особенности остановки клеточного цикла, вероятно, отражают специфику генетических мишеней STAT5 (по сравнению со STAT3), что требует проведения дальнейших исследований.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 09-04-00492-а), программы РАН «Молекулярная и клеточная биология» и Государственного контракта № 02.740.11.0094.

Список литературы

Веренинов А. А., Виноградова Т. А., Ивахнюк И. С., Марахова И. И., Торопова Ф. В. 1982. Применение пламенно-эмиссионного анализа для измерения потоков щелочных катионов через клеточную мембрану. Цитология. 24 (1) : 98—103.

Alexander W. S., Hilton D. J. 2004. The role of suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins in regulation of the immune response. *Annu. Rev. Immunol.* 22 : 503—529.

Alvarez J. V., Frank D. A. 2004. Genome-wide analysis of STAT target genes: elucidating the mechanism of STAT-mediated oncogenesis. *Cancer Biol. Ther.* 3 : 1045—1050.

Amin H. M., McDonnell T. J., Ma Y., Lin Q., Fujio Y., Kunisada K., Leventaki V., Das P., Rassidakis G. Z., Cutler C., Medeiros L. J., Lai R. 2004. Selective inhibition of STAT3 induces apoptosis and G(1) cell cycle arrest in ALK-positive anaplastic large cell lymphoma. *Oncogene.* 23 : 5399—5407.

Amin H. M., Medeiros L. J., Ma Y., Feretzaki M., Das P., Leventaki V., Rassidakis G. Z., O'Connor S. L., McDonnell T. J., Lai R. 2003. Inhibition of JAK3 induces apoptosis and decreases anaplastic lymphoma kinase activity in anaplastic large cell lymphoma. *Oncogene.* 22 : 5399—5407.

Baus D., Pfitzner E. 2006. Specific function of STAT3, SOCS1, and SOCS3 in the regulation of proliferation and survival of classical Hodgkin lymphoma cells. *Int. J. Cancer.* 118 : 1404—1413.

Berridge M. J. 1997. Lymphocyte activation in health and disease. *Critical Rev. Immunol.* 17 : 155—178.

Bradford M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72 : 248—254.

Cochet O., Frelin C., Peyron J. F., Imbert V. 2006. Constitutive activation of STAT proteins in the HDLM-2 and L540 Hodgkin lymphoma-derived cell lines supports cell survival. *Cell Signal.* 18 : 449—455.

Darnell J. E., jr. 1997. STATs and gene regulation. *Science.* 277 : 1630—1635.

Ferrajoli A., Faderi S., Van Q., Koch P., Harris D., Liu Z., Hazan-Halevy I., Wang Y., Katarjian H. M., Priebe W., Estrov Z. 2007. WP12066 disrupts Janus kinase-2 and induces caspase-dependent apoptosis in acute myelogenous leukemia cells. *Cancer Res.* 67 : 11 291—11 299.

Khwaja A. 2006. The role of Janus kinases in haemopoiesis and haematological malignancy. *Br. J. Haematol.* 134 : 366—384.

Kim B. H., Yin C. H., Guo Q., Bach E. A., Lee H., Sandoval C., Jayabose S., Ulaczyk-Lesanko A., Hall D. G., Baeg G. H. 2008. A small-molecule compound identified through a cell-based screening inhibits JAK/STAT pathway signaling in human cancer cells. *Mol. Cancer Ther.* 7 : 2672—2780.

Kirken R. A., Erwin R. A., Wang L., Wang Y., Rui H., Farrar W. L. 2000. Functional uncoupling of the Janus-kinase 3-Stat5 pathway in malignant growth of human T cell leukemia virus type 1-transformed human T-cells. *Immunology.* 165 : 5097—5104.

Kube D., Holtick U., Vockerodt M., Ahmadi T., Haier B., Behrmann I., Heinrich P. C., Diehl V., Tesch H. 2001. STAT3 is constitutively activated in Hodgkin cell lines. *Blood.* 98 : 762—770.

Leonard W. J. 2001. Cytokines and immunodeficiency diseases. *Immunology.* 166 : 200—208.

Leonard W. J., Lin J.-X. 2000. Cytokine receptor signaling pathways. *J. Allergy Clin. Immunol.* 105 : 877—888.

Lewis R. S., Ward A. C. 2008. Stat5 as a diagnostic marker for leukemia. *Exp. Rev. Mol. Diagn.* 8 : 73—82.

Lin J.-X., Leonard W. J. 2000. The role of STAT5a and STAT5b in signaling by IL-2 family cytokines. *Oncogene.* 19 : 2566—2576.

Nagy Z. S., Rui H., Stepkowski S. M., Karras J., Kirken R. A. 2006. A preferential role for STAT5, not constitutively active STAT3, in promoting survival of a human lymphoid tumor. *J. Immunol.* 177 : 5032—5040.

Ozawa Y., Williams A. H., Estes M. L., Matsushita N., Boschelli F., Jove R., List A. F. 2008. Src family kinases promote AML cell survival through activation of signal transducers and activators of transcription (STAT). *Leuk. Res.* 32 : 893—903.

Pesu M., Candotti F., Husa M., Hofmann S. R., Notarangelo L. D., O'Shea J. J. 2005. Jak3, severe combined immunodeficiency, and a new class of immunosuppressive drugs. *Immunol. Rev.* 203 : 127—142.

Rane S. G., Reddy E. P. 2000. Janus kinases: components of multiple signaling pathways. *Oncogene.* 19 : 5662—5679.

Sudbeck E. A., Liu X. P., Narla R. K., Mahajan S., Ghosh S., Mao C., Uckun F. M. 1999. Structure-based design of specific inhibitors of Janus kinase 3 as apoptosis-inducing antileukemic agents. *Clin. Cancer Res.* 5 : 1569—1582.

Tong H., Ren Y., Zhang F., Jin J. 2008. Homoharringtonine affects the JAK2-STAT5 signal pathway through alteration of protein tyrosine kinase phosphorylation in acute myeloid leukemia cells. *Eur. J. Haematol.* 81 : 259—266.

Turkson J., Jove R. 2000. STAT proteins: novel molecular targets for cancer drug discovery. *Oncogene.* 19 : 6613—6626.

Wang L. H., Kirken R. A., Erwin R. A., Yu C.-R., Farrar W. L. 1999. JAK3, STAT, and MAPK signalling pathways as novel molecular targets for the tyrosine kinase inhibitor AG-490 regulation of IL-2-mediated T cell response. *J. Immunol.* 162 : 3897—3904.

Yamaoka K., Saharinen P., Pesu M., Holt V. E.-3rd, Silvennoinen O., O'Shea J. J. 2004. The Janus kinases (Jaks). *Genome Biol.* 5 : 253—259.

SPECIFIC FUNCTION OF STAT5 IN REGULATION OF PROLIFERATION
OF CHRONIC LEUKEMIA K562 CELLS: INHIBITORY EFFECT OF WHI-P131*E. V. Mityushova, N. D. Aksenov, I. I. Marakhova*¹¹ Institute of Cytology RAS, St. Petersburg;
e-mail: iim@mail.cytspb.rssi.ru

In this study, we examined the possible role of JAK/STAT signaling pathway in regulation of proliferation of chronic leukemia cells K562. The tyrosine phosphorylation of STAT3 and STAT5 was used as a marker of an activation status of STAT proteins. We demonstrate that in growing culture of K562 both STAT3 and STAT5 are constitutively activated. To determine the significance of STATs activity in maintaining the high level of K562 proliferation we tested two JAK inhibitors: AG-490 (JAK2 and JAK3 inhibitor) and WHI-P131 (a new specific JAK3 inhibitor). We showed that in long-term cultures (48 h) of K562 cells with AG-490 or WHI-P131 the cells remain viable. It was found that treatment with WHI-P131 (30—100 μ M) decreased the tyrosine phosphorylation of STAT5 being without effect on the high level of STAT3 phosphorylation. In proliferating K562 cells, AG-490 (25—50 μ M) did not influence STAT3 and STAT5 phosphorylation. The flow cytometry analysis revealed a dose-dependent decrease in G₁ and S phases and an increase in G₂/M phases in WHI-P131-treated K562 cell cultures and no changes in cell cycle structure in AG-490-treated cells. Thus, our findings indicate a preferential role for STAT5 (not constitutively active STAT3) in proliferation of leukemia to other JAK drugs which stimulate apoptosis and decrease proliferation, WHI-P131 prevents K562 cells growth by arresting in G₂/M phases of cell cycle.

Key words: JAK/STAT signaling, STAT3, STAT5, WHI-P131, AG-490, proliferation, K562 cells.
