

РЕГУЛЯТОР КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА p130 И β -КАТЕНИН ФОРМИРУЮТ КОМПЛЕКС В МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТКАХ

© Н. С. Петров, О. В. Жидкова, В. В. Зенин, Ю. М. Розанов, Б. В. Попов¹

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;

¹ электронный адрес: porov_478@hotmail.com

Супрессорный комплекс p130/E2f4 транскрипционно подавляет синтез множества белков, регулирующих ход клеточного цикла, и останавливает клетки в фазах G₀/G₁, что является необходимым условием начала клеточной дифференцировки для клеток многих тканей. Мы нашли, что в мезенхимных стволовых клетках (МСК) индукция сигнального пути Wnt/ β -катенин, вызванная путем их кокультивирования с клетками линии A-549 или культивированием в среде с ионами лития, сочетается с накоплением активных форм p130, E2f4 и β -катенина, но не сопряжена с торможением клеточного цикла. Синхронизация МСК в клеточном цикле при их обработке тимидином и нокадазолом не сопровождается изменением уровня и рисунка фосфорилирования p130. В противоположность МСК мышинные гепатоциты и клетки линии T98G характеризуются накоплением фосфорилированных форм p1 и p2 p130 в покое, а формы p3 — при активной пролиферации. Антитела к p130 копреципитируют из экстрактов МСК β -катенин, а антитела к β -катенину — p130. Полученные данные позволяют предположить, что p130, β -катенин и Gsk3 β формируют в МСК комплекс, функциональная роль которого заключается в изменении свойства p130 тормозить выход клеток из состояния покоя и регулировать сопряжение остановки клеточного цикла с активацией дифференцировки.

Ключевые слова: мезенхимные стволовые клетки, p130, Wnt/ β -катенин, E2f4, клеточный цикл, дифференцировка.

Принятые сокращения: АО — аминокислотные остатки, ИП — иммунопреципитация, МСК — мезенхимные стволовые клетки, ПЦР — полимеразная цепная реакция, РС — ростовая среда, Cdk — циклинзависимая киназа, FBS — фетальная бычья сыворотка, PBS — фосфатный буфер, pRb — продукт гена ретинобластомы, SDS-PAGE — электрофорез с додецилсульфатом натрия в полиакриламидном геле, WB — иммуноблоттинг.

Сопряжение сигнальных путей, регулирующих прогрессию клеточного цикла и клеточную дифференцировку, во многих клеточных линиях происходит в состоянии клеточного покоя в контрольной точке R₁ фазы G₁ клеточного цикла (Weinberg, 1995). Регуляция выхода из фазы G₁ осуществляется белком p130 — членом семейства продукта гена ретинобластомы (pRb), формирующим супрессорные комплексы с транскрипционным фактором E2f4 (Tommasi, Pfeifer, 1995; Smith et al., 1996). E2f4 — член семейства E2F, выполняющего ключевую роль в транскрипционной регуляции активности множества генов, продукты которых формируют механизмы контроля хода клеточного цикла (Cobrinik, 2005).

Уровень p130 и комплексов p130/E2f4 в клетках повышен в состоянии покоя, т. е. в фазах G₀/G₁ (Vairo et al., 1995). В переходе G₁/S количество p130 резко снижается, а в некоторых клеточных линиях белок не определяется от начала фазы S до окончания клеточного цикла (Smith et al., 1998). Физиологическая целесообразность уменьшения уровня p130 в пролиферирующих клетках заключается в отмене его негативного влияния на синтез белков, необходимых для хода клеточного цикла, и на активность комплексов циклин E/A/Cdk2, инициирующих репликацию ДНК (Chevalier et al., 1996).

Способность p130 влиять на ход клеточного цикла и его взаимодействие с фактором E2f4 регулируется путем фосфорилирования. В p130 найдены 22 специфических мотива, содержащих сериновые (Ser) и треониновые (Thr) аминокислотные остатки (АО), которые фосфорилируются *in vivo* (Hansen et al., 2001). p130 последовательно фосфорилируется в процессе клеточного деления киназами циклин D-Cdk4/6 и циклин E/A — Cdk2, а в состоянии покоя — киназой Gsk3 β (Mayol et al., 1995; Litovchick et al., 2004). Всю молекулярную популяцию p130 условно подразделяют на три группы: содержащие соответственно гипофосфорилированные (p1), фосфорилированные (p2) и гиперфосфорилированные (p3) формы белка (Mayol, Grana, 1998). Формы p1 и p2 p130 плохо включают радиоактивную метку, стабильны в культуре *in vitro* в ходе цикла, в котором они накапливаются в фазах G₀/G₁. Эти формы составляют весь p130 в клетках тканей организма, для которых свойственно преобладание покоящихся дифференцированных клеток (Garriga et al., 1998).

Образование формы p3 p130 в переходе G₁/S происходит в результате фосфорилирования белка киназой Cdk4/6 по Ser672, которое придает p130 сигнал для убиквитинации, распознаваемый лигазой SCF^{Skp2} (Tedesco et al., 2002). Фосфорилирование по Ser672 сопровождается

переходом всех молекул p130 в гиперфосфорилированную форму p3, которая подвергается деградации в протеасомах. Деградация p130 лежит в основе последующего снижения его уровня в фазах S и G₂/M (Smith et al., 1998).

Мишенью Gsk3β являются АО Ser948, Ser962 и Ser982, расположенные в короткой неконсервативной последовательности функционального домена «В» p130, которая называется «петля». Модификация киназой Gsk3β области «петли» p130 нуждается в предварительном фосфорилировании другими киназами АО, расположенных в положении +4 по отношению к АО, модифицируемых Gsk3β, т. е. Ser952, Ser966 и Ser986. Фосфорилирование киназой Gsk3β стабилизирует структуру p130 и, вероятно, повышает эффективность формирования комплексов p130/E2f4 (Litovchick et al., 2004).

В активно пролиферирующих клетках различной тканевой специфичности, например в клетках глиобластомы человека линии T98G, мышечных миобластах линии C2C12, крысиных миобластах линии L6, и многих других клеточных линиях продуцируются все три формы p130, однако при индукции дифференцировки образование формы p3 тормозится. Клетки печени, находящиеся в нормальных условиях в состоянии покоя, продуцируют только формы p1 и p2, но уже через 6—12 ч после экспериментального удаления части органа происходит активация пролиферации гепатоцитов, которые продуцируют все три формы белка (Garriga et al., 1998).

Одной из основных физиологических мишеней киназы Gsk3β является β-катенин, передатчик сигналов семейства факторов Wnt в каноническом сигнальном пути Wnt/β-катенин. После перемещения из цитоплазмы в ядро β-катенин взаимодействует с факторами семейства LEF/TCF, что ведет к активации транскрипции генов, участвующих в регуляции различных клеточных функций, включая дифференцировку (Reya, Clevers, 2005). Модификация киназой Gsk3β белков p130 и β-катенина, играющих ключевую роль в сигнальных путях, регулирующих клеточный цикл и дифференцировку, предполагает возможность сопряженной регуляции этих клеточных функций через Gsk3β.

Рассмотренные выше данные показывают, что в фазах G₀/G₁ p130 является мишенью сочетанной регуляции Cdkс и Gsk3β, которые представляют различные сигнальные пути. Такая кооперативная регуляция p130, по-видимому, дает возможность клетке координировать ход клеточного цикла и дифференцировки, осуществляемой с участием сигнального пути Wnt/β-катенин. Для изучения подобной регуляции в МСК мы использовали модели активации сигнального пути Wnt/β-катенин путем их культивирования в среде с ионами лития и кокультивирования с легочными эпителиальными клетками линии А-549.

При кокультивировании с клетками линии А-549 в условиях разделения клеток полунепроницаемой мембраной в МСК происходят накопление и активация β-катенина, что сопряжено с индукцией экспрессии цитокератинов и других маркеров эпителиальной дифференцировки (Porov et al., 2007). Клетки А-549 секретируют фактор Wnt2, который в культуральной среде связывает специфические рецепторы на МСК и паракринно активирует в них сигнальный путь Wnt/β-катенин (Etheridge et al., 2004; You et al., 2004). Ионы лития имитируют активацию сигнального пути Wnt/β-катенин путем ингибиции Gsk3β, что способствует накоплению в ядре β-катенина и индукции его мишеней (Stambolic et al., 1996).

Задача настоящего исследования заключалась в оценке предположения о формировании комплекса между белками p130 и β-катенином в МСК в условиях их синхронизации в различных фазах клеточного цикла или активации сигнального пути Wnt/β-катенин. Полученные нами результаты позволяют предполагать, что в ходе клеточного цикла в МСК формируется стабильный комплекс между p130, β-катенином и Gsk3β, который может регулировать сопряженность остановки клеточного цикла и индукции дифференцировки.

Материал и методика

Культура клеток, синхронизация в клеточном цикле и анализ с помощью проточной цитометрии. Клетки линии А-549 (немелкоклеточной карциномы легких человека) и Т98G (глиобластомы человека), полученные из американской коллекции клеточных культур (АТСС), культивировали в ростовой среде (РС) Дульбекко (DMEM/F12), содержащей 25 мМ Нерес и 10 % эмбриональной бычьей сыворотки (ЭБС). Мезенхимные стволовые клетки (МСК) были получены ранее (Porov et al., 2007) из костного мозга трансгенных мышей-самцов C57BL/6-Tg(АСТbEGF)10sb/J с убиквитарной экспрессией Gfr, приобретенных в коммерческой лаборатории (Jackson Laboratories, США).

МСК синхронизировали в клеточном цикле с помощью обработки тимидином и нокодазолом (Fang et al., 1998). С этой целью клетки, растущие в нормальной ростовой среде с 40 % насыщения пластиковой поверхности, переводили на 24 ч в среду, содержащую 2 мМ тимидина (Sigma, США), для остановки деления в фазе S. Затем клетки на пластике очищали от тимидина путем однократной отмывки 5 мл стерильного PBS и добавляли в чашки на 3 ч нормальную РС. В РС добавляли нокодазол (Sigma, США) в концентрации 100 нг/мл на 18 ч для остановки деления в фазе М. Среду с нокодазолом удаляли, клетки на пластике промывали 5 мл PBS, культивировали 6 ч в нормальной РС и собирали с чашек пластиковым скребком для последующего анализа. Количество клеток в различных фазах клеточного цикла определяли с помощью проточной цитометрии. В соответствии с максимальным количеством клеток, аккумулированных в фазе S или G₂/M, клетки после обработки тимидином и нокодазолом условно называли «синхронизированными в фазе S», а после рестимуляции FBS — «синхронизированными в фазах G₂/M».

Для синхронизации клеток линии Т98G экспоненциальные культуры выращивали в течение 72 ч в РС с 0.1 % FBS, рестимулировали 10%-ной FBS и использовали в опытах с синхронизацией с интервалом 6 ч после рестимуляции (Porov et al., 2005).

Для опытов с кокультивированием 1 · 10⁵ клеток линии А-549 ресуспендировали в 1 мл РС и помещали в верхний отдел лунки 6-луночной пластины (Costar, США), отделенный от нижнего отдела, покрытой коллагеном полунепроницаемой мембраной Transwell с размером пор 0.4 мкм (Corning, США). В нижний отдел той же лунки добавляли 3 мл РС и покровные стекла для микроскопии, а через 24 ч помещали 1 · 10⁵ МСК. Количество МСК и ход их клеточного цикла в опыте и контроле оценивали каждые 24 ч. Через 72 ч от начала культивирования клетки на покровных стеклах использовали для иммунофлуоресцентного анализа. В контрольных пласти-

нах МСК культивировали без клеток линии А-549. Для стимуляции ионами лития МСК инкубировали 4 ч в ростовой среде с 10 мМ LiCl (Sigma, США).

Анализ клеточного цикла производили на ламповом проточном цитометре АТС 1000 (Brucker, Германия). Клетки окрашивали иодистым пропидием; для возбуждения флуоресценции применяли фильтры 475—500 нм, для приема флуоресценции — 600—650 нм.

Антитела. Кроличьи поликлональные антитела к E2f4 (sc-866x) и кроличьи поликлональные антитела против p130 (sc-317x) были куплены в компании Santa Cruz Biotechnology, Inc. (США); кроличьи поликлональные антитела против β -катенина (C2206 и C2982) — в компаниях Sigma (США) и Abcam (Великобритания); кроличьи поликлональные антитела против Gsk3 β (AB 8687 и sc-9166) — в компаниях Millipore (США) и Santa Cruz Biotechnology, Inc. (США); моноклональные антитела против β -актина (клон AC-15) и вторичные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена (HRP), были приобретены в компании Sigma (США); неконъюгированные кроличьи антитела против иммуноглобулинов мыши для иммунопреципитации (R0881) — в компании Sigma (США); видоспецифичные антитела Alexa Fluor® 568 и Fab-фрагмент кроличьих антимышиных антител — в компании Invitrogen (США); Alexa Fluor® 633 Fab-фрагмент козлиных антител против легких и тяжелых цепей иммуноглобулинов кролика — в компании Invitrogen (США).

Иммунофлуоресцентное окрашивание. Клетки окрашивали на внутриклеточные белки по следующему протоколу: покровные стекла с клетками, расплавленными при росте в культуре, переносили в культуральные чашки 35 мм, клетки однократно отмывали PBS 5 мин, фиксировали 4%-ным параформальдегидом 15 мин, затем 70%-ным этиловым спиртом в течение ночи при 4 °С, обрабатывали 0.2%-ным детергентом Тритон X-100 10 мин, промывали PBS 2 раза по 5 мин, сайты неспецифического связывания антител блокировали 1 ч раствором, содержащим 3 % бычьего сывороточного альбумина (БСА) и 0.1 % Твина 20; затем на клетки наносили специфические антитела в разведении 1 : 50—1 : 200 в блокирующем растворе на 1 ч при комнатной температуре, промывали 3 раза по 5 мин PBS, обрабатывали 1 ч при комнатной температуре видоспецифическими антителами, распознающими аллотипы иммуноглобулинов специфических антител, конъюгированными с флуоресцентной меткой, отмывали 3 раза по 5 мин PBS. Ядра клеток красили 30 мин при комнатной температуре красителем DAPI в концентрации 1 нг/мл в блокирующем растворе, затем препараты промывали 2 раза PBS и заключали в среду Anti-Fade, уменьшающую неспецифическую флуоресценцию. Иммунофлуоресцентные изображения получали на конфокальном сканирующем микроскопе Pascal, используя лазеры с длинами волн 488 и 633 нм.

Электрофорез в полиакриламидном геле, иммуноблоттинг и иммунопреципитация. Электрофорез белков проводили в 8%-ном полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия. Для приготовления проб клетки, растущие в культуральных чашках, промывали дважды PBS, удаляли с чашек пластиковым скребком, осаждали центрифугированием и лизировали при периодическом ресуспендировании в течение 30 мин на льду в трех объемах буферного раствора (относительно объема плотного осадка клеток), содержащего 25 мМ Трис-НСl (рН 7.4), 250 мМ NaCl, 0.25%-ный детергент NP-40, 1 мМ PMSF, коктейль ингибиторов протеаз и

фосфатаз (Sigma, США) в разведении 1 : 100. Экстракты клеток центрифугировали 15 мин при 13 000 g и 4 °С и супернатанты использовали для последующих опытов. Пробу уравнивали по количеству общего белка, определяемого с помощью реактива Брэдфорд, переносили в микропробирки, содержащие равный объем буфера для нанесения проб на гель (4 % додецилсульфата натрия, 20 % глицерина, 200 мМ дитиотрепта, 120 мМ Трис-НСl, рН 6.8, 0.002 % бромфенолового синего), кипятили 5 мин на водяной бане и наносили в объеме 25 мкл, содержащем 30 мкг общего белка, на одну дорожку полиакриламидного геля. Электрофоретически разделенные белки переносили с геля на мембрану PVDF с помощью полусухого электропереноса. Белки на мембране выявляли специфическими антителами и визуализировали реактивом ECL (Sigma, США).

Для преципитации комплексов антиген—антитело клеточные осадки лизировали при температуре тающего льда 30 мин специальным буферным раствором, содержащим 50 мМ Hepes, рН 7.5, 150 мМ NaCl, 1 мМ EDTA, 2.5 мМ EGTA, 10 % глицерина, 0.1 % Твина 20 и ингибиторы протеаз и фосфатаз в разведении 1 : 100. Затем клетки подвергали обработке ультразвуком на ультразвуковом процессоре Cole-Parmer 130-Watt Ultrasonic Processors, используя следующие параметры: амплитуда 60 %, 3 импульса продолжительностью 10 с каждый. Экстракты клеток центрифугировали 15 мин при 13 000 g и 4 °С; супернатанты использовали для последующей иммунопреципитации. С этой целью к 500 мкл клеточного экстракта, содержащего 500 мкг белка, добавляли 5 мкг специфических антител на 90 мин, обработку антителами проводили при постоянной ротации при 4 °С. Затем к экстрактам добавляли 30 мкг антител к иммуноглобулинам кролика (Sigma, США) на 1.5 ч с последующим добавлением 30 мкл 10%-ной протеин-G сефарозы на 1.5 ч. Преципитаты отмывали путем 3-кратного центрифугирования при 2000 об/мин в буфере для иммунопреципитации и 2-кратного центрифугирования в таком же буфере без детергента. Последующая обработка включала в себя кипячение проб в течение 5 мин в буфере для нанесения на гель, центрифугирование для отделения сефарозы и нанесение на полиакриламидный гель.

Реактивы. В работе использовали следующие реактивы: Anti-Fade, PVDF, полиакриламид для электрофореза, реактив Брэдфорд (BioRad, США); глицерин, нокодазол, тимидин, хлористый литий, дитиотрепт, БСА, додецилсульфат натрия, коктейль ингибиторов протеолиза и ингибиторов фосфатаз, NP-40, DAPI, PMSF, параформальдегид, Тритон X-100, Трис (Sigma, США); трипсин, содержащий 1 мМ ЭДТА, среда DMEM/F12, FBS (Invitrogen, США); ECL (Millipore, США); культуральные пластиковые чашки (Sarstedt, Германия); Twin 20 (Bio Chemical, Германия); KCl, метиловый спирт, уксусная кислота (Реахим, Россия).

Ткань печени для приготовления клеточных экстрактов получали от 8—12-недельных мышей-самок линии C57BL массой 18—22 г, приобретенных в питомнике лабораторных животных Рапполово (Ленинградская обл., Россия).

Результаты

Кокультивирование с клетками линии А-549 или рост в среде, содержащей ионы лития, вызывает в МСК сочетанное повышение уровня и активацию p130, E2f4 и β -кате-

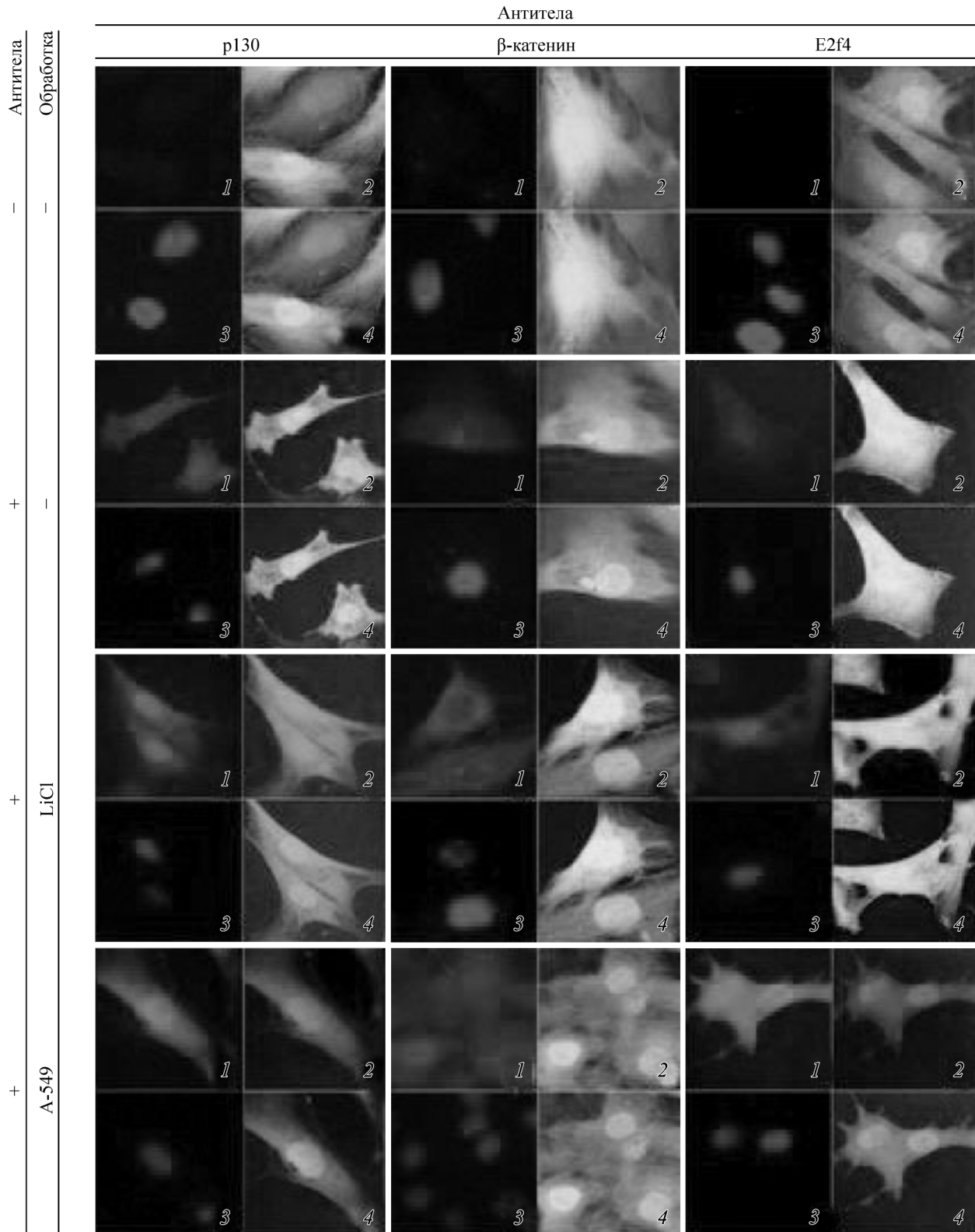


Рис. 1. Иммунофлуоресцентная характеристика экспрессии p130, β -катенина и E2f4 в МСК в условиях их культивирования в среде с ионами Li^+ или кокультивирования с клетками линии А-549.

1 — специфические антитела, 2 — естественная флуоресценция, 3 — окраска Dapi, 4 — совмещение всех изображений. Изображения получены на конфокальном сканирующем микроскопе Pascal, лазеры с длинами волн 488 и 633 нм, об. 100 \times .

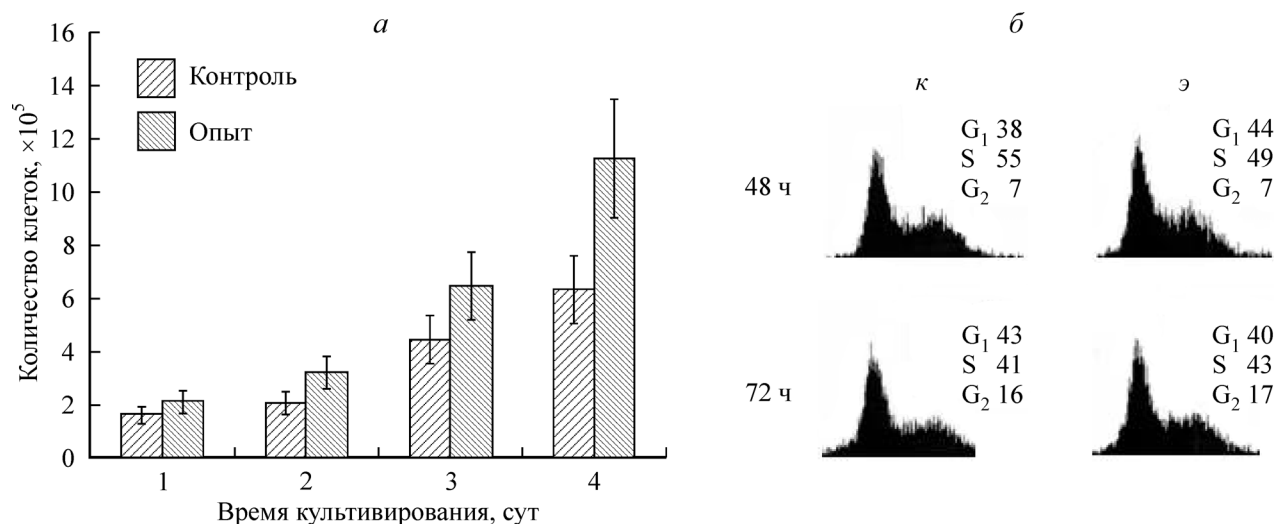


Рис. 2. Оценка пролиферативной активности МСК при кокультивировании с клетками линии А-549.

а — изменение количества МСК в процессе кокультивирования с клетками линии А-549; вертикальные линии — стандартное отклонение; б — цитометрическая характеристика МСК, кокультивированных с клетками линии А-549; κ — контроль, э — эксперимент.

нина. В настоящей работе были использованы МСК 12—25 пассажей, полученные нами ранее из костного мозга трансгенных мышей GFP и охарактеризованные в процессе длительного культивирования по маркерной специфичности, пролиферативному и дифференцировочному потенциалу, клоногенной, адгезивной и туморогенной активности (Роров et al., 2007; Попов и др., 2009).

Иммунофлуоресцентный анализ показал, что в нормальных условиях в культуре МСК экспрессируют незначительное количество p130, β-катенина и E2f4, которые распределяются равномерно между цитоплазмой и ядром. Обработка ионами лития вызывала в МСК увеличение продукции всех названных белков и усиливала их ядерную локализацию (рис. 1). В еще большей степени повышение уровня p130, β-катенина и E2f4, перемещение их в ядро клетки возникали при кокультивировании МСК с клетками линии А-549.

Результаты иммуноблотинга p130, β-катенина и E2f4 с использованием экстрактов МСК, растущих в среде с ионами лития или кокультивированных с клетками линии А-549 (результаты не показаны), полностью соответствовали вышеописанным данным иммунофлуоресценции. Уровень β-катенина в МСК повышался, что сочеталось с появлением быстро мигрирующих при электрофорезе форм белка. Уровень p130 также повышался, белок становился более гипофосфорилированным и мигрировал быстрее, чем в нормальных условиях. В нормальных условиях МСК продуцировали незначительное количество E2f4, включающего в себя несколько гипофосфорилированных форм. После обработки клеток хлористым литием уровень E2f4 повышался, а при электрофорезе клеточных экстрактов выявлялись его гиперфосфорилированные формы. При кокультивировании с клетками линии А-549 МСК выявляли изменения уровня и фосфорилирования p130, E2f4 и β-катенина, подобные тем, которые описаны выше в случае активации клеток ионами лития.

Оценка пролиферативной активности МСК, кокультивированных с клетками линии А-549, и характеристика параметров их клеточного цикла. Пролиферативная активность МСК, кокультивированных с клетками А-549, не уменьшалась, а, напротив, возрастала (рис. 2, а). Тенденция к активации

пролиферации выявлялась уже через 24 ч после начала кокультивирования, усиливалась на 2-е и 3-и сут и проявлялась в форме небольших, но достоверных различий на 4-е сут. Цитометрическая оценка пролиферативного статуса кокультивированных МСК показала, что в опыте клетки, подобно контрольным МСК, находятся в стадии активной пролиферации (рис. 2, б).

Изучение уровня и рисунка фосфорилирования p130 и β-катенина в МСК в ходе клеточного цикла. Использование протокола, в соответствии с которым МСК обрабатывали 24 ч тимидином с последующим их культивированием в течение 18 ч в среде с нокадазолом, позволило значительно увеличить число клеток в фазе S, тогда как последующая рестимуляция S-фазных МСК FBS увеличивала число клеток в фазах G₂/M (рис. 3, а).

Сравнение уровня продукции и характера фосфорилирования p130 в асинхронно делящихся и синхронизированных МСК в фазах S и G₂/M не выявило различий. В каждой популяции p130 присутствовал во всех трех молекулярных формах p1, p2 и p3 (рис. 3, б). Напротив, в гепатоцитах мыши выявлялись только формы p1 и p2 p130. В клетках линии T98G, использованных, подобно гепатоцитам, в качестве контрольных клеток, способных синхронизироваться в клеточном цикле в условиях роста в среде, лишенной FBS, уровень и характер фосфорилирования p130 значительно изменялись в ходе клеточного цикла. В асинхронно делящихся клетках отмечался высокий уровень продукции p130 и присутствовали все три его формы (рис. 3, в). Форма p3 p130 отсутствовала в фазах G₀ и G₁, но появлялась в точке 12 ч после рестимуляции клеток FBS, соответствующей переходу G₁/S. Появление гиперфосфорилированной формы p3 p130 сопровождалось резким уменьшением его общего уровня в последующих фазах S и M клеточного цикла, в ходе которых выявлялось небольшое количество гиперфосфорилированной формы p3. Количество и характер фосфорилирования E2f4 и β-катенина в асинхронных и синхронизированных в клеточном цикле МСК не различались. Напротив, в клетках печени эти белки находились соответственно в гипер- и гипофосфорилированных формах (рис. 3, б).

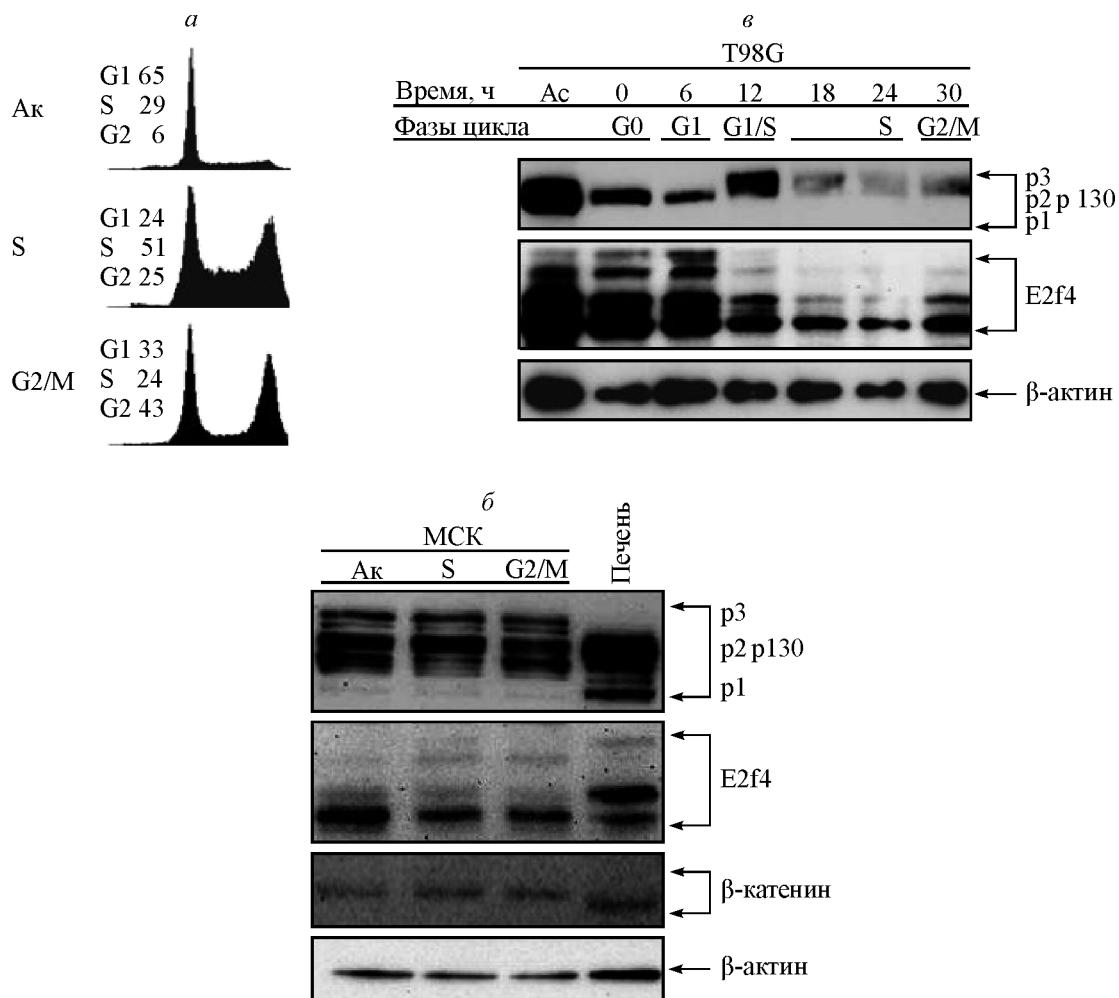


Рис. 3. Сравнительная характеристика уровня и рисунка фосфорилирования p130 и β -катенина в МСК.

а — цитометрическая характеристика МСК, синхронизированных в различных фазах клеточного цикла; Ак — асинхронно делящиеся клетки, S, G₂/M — клетки, синхронизированные соответственно в фазах S и G₂/M МСК; *б* — уровень и рисунок фосфорилирования p130 и β -катенина в асинхронных и синхронизированных в фазах S и G₂/M МСК; p1, p2, p3 — различные формы p130, различающиеся по электрофоретической подвижности; HC Ig — тяжелые цепи иммуноглобулинов кролика, используемых в качестве вторых антител для ИП. *в* — изменение уровня и рисунка фосфорилирования p130 и E2f4 в ходе клеточного цикла в клетках линии T98G.

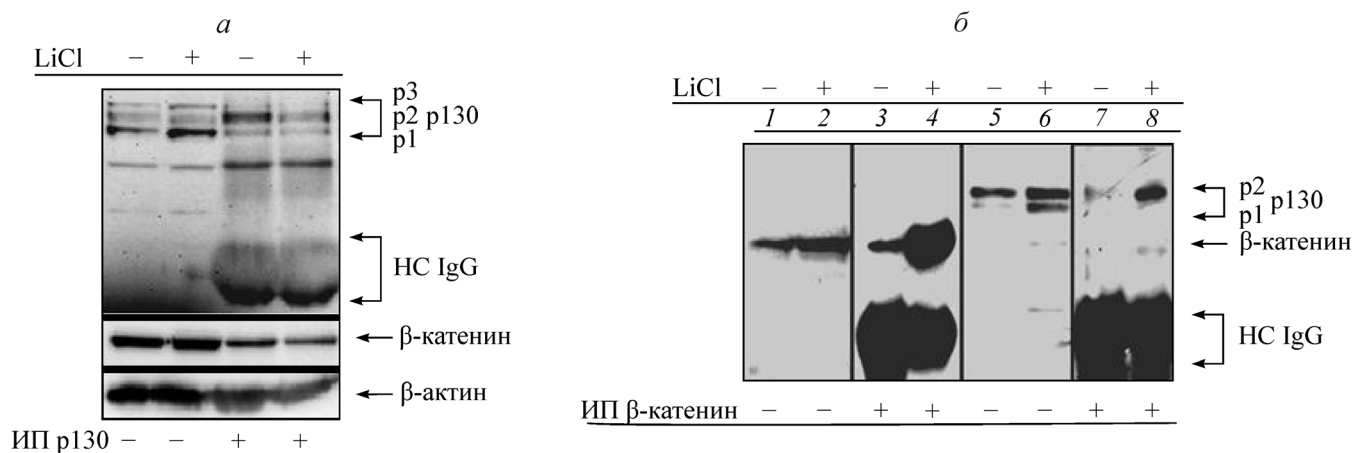


Рис. 4. p130 и β -катенин формируют комплекс в МСК.

а — β -катенин коиммунопреципитируется антителами к p130; HC IgG — тяжелые цепи иммуноглобулинов кролика, ИП — иммунопреципитация. *б* — p130 коиммунопреципитируется антителами к β -катенину. Обозначения те же, что и на рис. 3.

p130 и β -катенин формируют комплекс в МСК. Антитела к p130 преципитировали из экстрактов МСК преимущественно форму p2 этого белка, в меньшей степени — форму p1 и не осаждали форму p3 (рис. 4, а). В преципитатах из экстрактов контрольных и стимулированных ионами лития МСК, полученных с помощью антител к p130, выявлялся β -катенин (рис. 4, а). Несмотря на увеличенный уровень β -катенина, выявляемый путем иммуноблоттинга после стимуляции МСК ионами лития, количество белка в преципитатах нормальных и стимулированных клеток не различалось.

Антитела к β -катенину преципитировали из экстрактов МСК, стимулированных ионами лития, значительно большее количество белка, чем из экстрактов нестимулированных клеток (рис. 4, б). Уровень p130 при стимуляции ионами лития повышался, а рисунок его фосфорилирования характеризовался появлением быстро подвижных гипофосфорилированных форм при сравнении с контролем (рис. 4, б, дорожки 5, 6). Антитела к β -катенину копреципитировали из экстрактов МСК p130, причем, подобно антителам к p130, в данном случае в преципитатах выявлялась форма p2 белка, количество которой значительно возрастало после стимуляции клеток ионами лития (рис. 4, б, дорожки 7, 8). Антитела к Gsk3 β копреципитировали из экстрактов нормальных и стимулированных ионами лития МСК как β -катенин, так и p130 (результаты не показаны).

Обсуждение

В состоянии покоя активность генов, регулирующих прохождение фаз S и G₂/M клеточного цикла, супрессирована (Sun et al., 2007). Эта супрессия опосредована торможением транскрипции множества генов, промотеры которых содержат сайты связывания белков семейства E2F и взаимодействуют с одним из факторов этого семейства — E2f4. E2f4 формирует комплекс с p130, который транскрипционно подавляет синтез белков, участвующих в контроле клеточного цикла и репликации ДНК, контрольной точке повреждения ДНК, репарации ДНК, сборке и конденсации хроматина, расхождении хромосом и контрольной точке митотического веретена (Garriga et al., 1998; Ren et al., 2002). В E2f4 отсутствует сигнал ядерной локализации, поэтому он способен лишь к пассивному перемещению из цитоплазмы в ядро в фазах G₀/G₁, в которых выявляется высокий уровень ядерного p130, содержащего сигнал ядерной локализации (Muller et al., 1997; Chestukhin et al., 2002).

Функциональная активность p130, связанная с клеточным циклом, регулируется путем фосфорилирования Cdk. Современные публикации показывают, что в фазах G₀/G₁ p130 фосфорилируется также киназой Gsk3 β , одной из основных мишеней которой является β -катенин, передающий сигналы в каноническом сигнальном пути Wnt/ β -катенин (Litovchick et al., 2004). Роль фосфорилирования p130 киназой Gsk3 β недостаточно хорошо изучена. В наших опытах активация в МСК сигнального пути Wnt/ β -катенин путем их кокультивирования с клетками линии A-549 или культивирования в среде с ионами лития приводила к активации β -катенина, а также сопровождалась повышением уровня и изменением рисунка фосфорилирования p130 и E2f4 (рис. 1). Сочетанная активация в МСК p130 и E2f4 в условиях активации сигнального пути Wnt/ β -катенин не была сопряжена с торможе-

нием их пролиферативной активности (рис. 2, а). Несовпадение между активацией белков p130, E2f4, с одной стороны, и ускорением деления МСК — с другой, возможно, вызваны особенностями регуляции клеточного цикла в МСК, например формированием комплекса p130/E2f4/ β -катенин. По данным литературы, β -катенин способствует синтезу протоонкогена Мус и циклина D1 — индукторов фазы G₁ клеточного цикла — и потенциально способен тормозить супрессорные свойства p130 (Reya, Clevers, 2005).

В экстрактах асинхронно делящихся и синхронизированных в фазах S и G₂/M клеточного цикла МСК уровень и рисунок фосфорилирования p130 и E2f4 подобны, p130 представлен тремя различно фосфорилированными формами, включая гиперфосфорилированную форму p3, а E2f4 находится в неактивном гипофосфорилированном состоянии (рис. 3, б). Присутствие формы p3 p130, как правило, характеризует активацию деления клетки, например в клетках линии T98G форма p3 появляется в фазах G₁/S, что сопровождается уменьшением уровня p130 в последующих фазах клеточного цикла (рис. 3, в). По данным литературы, появление гиперфосфорилированной формы p3 p130 является причиной его убиквитинации и последующей деградации в протеасомах (Tedesco et al., 2002). В покоящихся гепатоцитах p130 присутствует в активных гипофосфорилированных формах p1 и p2 (рис. 3, б), а активация деления клеток печени, по данным литературы, сопровождается появлением формы p3 p130 (Mayol et al., 1995).

В нормальных условиях в клетках печени и покоящихся клетках линии T98G присутствуют активные гиперфосфорилированные формы E2f4 (рис. 3, б, в). Изложенные выше данные свидетельствуют о том, что в МСК в противоположность клеткам печени и клеткам линии T98G p130 и E2f4 теряют способность формировать активный супрессорный комплекс p130/E2f4, регулирующий ход клеточного цикла.

В растущих асинхронно и синхронизированных в фазах S и G₂/M МСК характер электрофоретической подвижности β -катенина не различается, что, вероятно, соответствует подобному уровню и характеру фосфорилирования белка в клетках, проходящих различные фазы клеточного цикла. Напротив, в покоящихся клетках печени β -катенин характеризуется быстрой электрофоретической подвижностью, что, по-видимому, соответствует его активному гипофосфорилированному состоянию (рис. 3, б). Возможно, что отсутствие в МСК в ходе клеточного цикла активации супрессорного комплекса p130/E2f4 вызвано физическим взаимодействием p130 с β -катенином. Gsk3 β , которая фосфорилирует β -катенин и p130 в фазах G₀/G₁ (Litovchick et al., 2004), может служить матрицей для их физического взаимодействия. Это предположение подтверждается результатами наших опытов, в которых антитела к p130 копреципитировали β -катенин (рис. 4, а), а антитела к β -катенину — p130 (рис. 4, б, дорожки 7, 8) из одних и тех же экстрактов нормальных или стимулированных ионами лития МСК. Интересно, что антитела к p130 преципитировали равное количество p130 и β -катенина из экстрактов нормальных и стимулированных ионами лития МСК, соответственно (рис. 4, а), тогда как антитела к β -катенину преципитировали значительно большее количество этих белков из стимулированных клеток (рис. 4, б, дорожки 3, 4 и 7, 8). Вероятно, использованные нами антитела к p130 в ИП взаимодействуют с низким аффинитетом с гипофосфорилированной формой

p130, продукция которой возрастает после стимуляции клеток ионами лития.

Преципитация с использованием антител к Gsk3 β подтвердила описанные выше результаты, свидетельствующие о том, что p130 и β -катенин входят в состав одного комплекса, включающего в себя Gsk3 β (результаты не показаны).

В целом полученные нами данные дают основание предположить, что в МСК p130 образует комплекс с β -катенином, что опосредовано Gsk3 β , которая фосфорилирует оба белка и может служить матрицей для их физического взаимодействия. В клетках печени *in vivo* и клетках линии T98G *in vitro* p130 формирует супрессорный комплекс p130/E2f4, препятствующий их выходу из состояния покоя. Фосфорилирование p130 в переходе G₁/S сопровождается его инактивацией и отменяет способность p130 формировать супрессорный комплекс с E2f4, способствуя выходу клеток в фазу S. В противоположность клеткам линии T98G и гепатоцитам в МСК формирование комплекса p130 β -катенин/Gsk3 β , вероятно, сопровождается отменой супрессорных свойств p130 и создает условия для изменения механизма сопряжения процессов пролиферации и дифференцировки.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 09-04-00595).

Список литературы

- Попов Б. В., Петров Н. С., Михайлов В. М., Томилин А. Н., Алексеев Л. Л., Гринчук Т. М., Зайчик А. М. 2009. Спонтанная трансформация и иммортализация мезенхимных стволовых клеток в культуре *in vitro*. Цитология. 51 (2) : 91—102.
- Chestukhin A., Litovchick L., Rudich K., DeCaprio J. A. 2002. Nucleocytoplasmic shuttling of p130/RBL2: novel regulatory mechanism. *Mol. Cell. Biol.* 22 : 453—468.
- Chevalier S., Couturier A., Chartrain I., Le Guellec R., Beckhelling C., Le Guellec K., Philippe M., Ford C. C. 1996. Xenopus cyclin E, a nuclear phosphoprotein, accumulates when oocytes gain the ability to initiate DNA replication. *J. Cell Sci.* 109 : 1173—1184.
- Cobrinik D. 2005. Pocket proteins and cell cycle control. *Oncogene.* 24 : 2796—2809.
- Etheridge S. L., Spencer G. J., Heath D. J., Genever P. G. 2004. Expression profiling and functional analysis of wnt signaling mechanisms in mesenchymal stem cells. *Stem Cells.* 22 : 849—860.
- Fang G., Yu H., Kirschner M. W. 1998. Direct binding of CDC20 protein family members activates the anaphase-promoting complex in mitosis and G₁. *Mol. Cell.* 2 : 163—171.
- Garriga J., Limón A., Mayol X., Rane S. G., Albrecht J. H., Reddy E. P., Andrés V., Graña X. 1998. Differential regulation of the retinoblastoma family of proteins during cell proliferation and differentiation. *Biochem. J.* 333 : 645—654.
- Hansen K., Farkas T., Lukas J., Holm K., Ronnstrand L., Bartek J. 2001. Phosphorylation-dependent and -independent functions of p130 cooperate to evoke a sustained G₁ block. *The EMBO J.* 20 : 422—432.
- Litovchick L., Chestukhin A., DeCaprio J. A. 2004. Glycogen synthase kinase 3 phosphorylates RBL2/p130 during quiescence. *Mol. Cell. Biol.* 24 : 8970—8980.
- Mayol X., Garriga J., Grana X. 1995. Cell cycle-dependent phosphorylation of the retinoblastoma related protein p130. *Oncogene.* 11 : 801—808.
- Mayol X., Grana X. 1998. The p130 pocket protein: keeping order at cell cycle exit/re-entrance transitions. *Front. Biosci.* 3 : 11—24.
- Muller H., Moroni M. C., Vigo E., Petersen B. O., Bartek J., Helin K. 1997. Induction of S-phase entry by E2F transcription factors depends on their nuclear localization. *Mol. Cell. Biol.* 17 : 5508—5520.
- Popov B., Chang L. S., Serikov V. 2005. Cell cycle-related transformation of the E2F4-p130 repressor complex. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 336 : 762—769.
- Popov B. V., Serikov V. B., Petrov N. S., Izusova T. V., Gupma N., Matthay A. 2007. Lung epithelial cells A549 induce epithelial differentiation in mouse mesenchymal BM stem cells by paracrine mechanism. *Tissue Eng.* 13 : 2441—2450.
- Ren B., Cam Y., Takahashi Y., Volkert T., Terragni J., Young R. A., Dynlacht B. D. 2002. E2F integrates cell cycle progression with DNA repair, replication, and G₂/M checkpoints. *Genes Develop.* 16 : 245—256.
- Reya T., Clevers H. 2005. Wnt signaling in stem cells and cancer. *Nature.* 434 : 843—850.
- Smith E. J., Leone G., Nevins J. R. 1998. Distinct mechanisms control the accumulation of the Rb-related p107 and p130 proteins during cell growth. *Cell Growth Differ.* 9 : 297—303.
- Smith E. S., Leone G., DeGregorio G., Jakoi L., Nevins J. R. 1996. The accumulation of an E2F-p130 transcriptional repressor distinguishes a G₀ cell state from a G₁ cell state. *Mol. Cell. Biol.* 16 : 6965—6976.
- Stambolic V., Ruel L., Woodgett J. R. 1996. Lithium inhibits glycogen synthase kinase-3 activity and mimics wingless signalling in intact cells. *Curr. Biol.* 6 : 1664—1668.
- Sun A., Bagella L., Tutton S., Romano G., Giordano A. 2007. From G₀ to S phase: a view of the roles played by the retinoblastoma (Rb) family members in the Rb-E2F pathway. *J. Cell. Biochem.* 102 : 1400—1404.
- Tedesco D., Lukas J., Reed S. I. 2002. The pRb-related protein p130 is regulated by phosphorylation-dependent proteolysis via the protein-ubiquitin ligase SCF^{Skp2}. *Genes Develop.* 16 : 2946—2957.
- Tommasi S., Pfeifer G. P. 1995. *In vivo* structure of the human cdc2 promoter: release of a p130-E2F-4 complex from sequences immediately upstream of the transcription initiation site coincides with induction of cdc2 expression. *Mol. Cell. Biol.* 15 : 6901—6913.
- Vairo G., Livingston D. M., Ginsberg D. 1995. Functional interaction between E2F4 and p130: evidence for distinct mechanisms underlying growth suppression by different retinoblastoma protein family members. *Genes Develop.* 9 : 869—881.
- Weinberg R. A. 1995. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell.* 81 : 323—330.
- You L., He B., Xu Z., Uematsu K., Mazieres J., Fujii N., Mikami I., Reguart N., McIntosh J. K., Kashani-Sabet M., McCormick F., Jablons D. M. 2004. An anti-Wnt-2 monoclonal antibody induces apoptosis in malignant melanoma cells and inhibits tumor growth. *Cancer Res.* 64 : 5385—5389.

THE CELL CYCLE REGULATOR P130 AND B-CATENIN FORM A COMPLEX
IN MESENCHYMAL STEM CELLSN. S. Petrov, O. V. Zhidkova, V. V. Zenin, Y. M. Rosanov, B. V. Popov¹

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg;

¹ e-mail: popov_478@hotmail.com

Suppressor complex p130/E2f4 inhibits transcription of multiple genes proteins regulating cell cycle progression and induces cell cycle arrest at G_0/G_1 required for induction of cell differentiation in cells of many tissues *in vivo* and various cell lineages *in vitro*. We found here that, in mesenchymal stem cells, (MSC) activation of the Wnt/ β -catenin signal pathway induced by MSC coculture with the A-549 cell line or by growth in the medium containing Li^+ ions, which resulted in the accumulation of active forms of the p130, E2f4 and β -catenin, was not coupled with inhibition of cell cycle progression. Cell cycle synchronization of the MSC induced by thymidine and nocodazol was not resulted in change of the levels and phosphorylation pattern of the p130 in contrast to mouse hepatocytes and T98G cells which showed accumulation of the p130 form p1 and p2 in quiescence and form p3 under active proliferative. Antibody to p130 precipitated from extracts of MSC activated by Li^+ ions β the p130 form 2 and hyperphosphorilated β -catenin. The results obtained suggest that Gsk3 β , p130 and β -catenin form in MSC a complex the functional role of which may be associated with activation of differentiation not coupled to cell cycle arrest.

Key words: mesenchymal stem cells, p130, Wnt/ β -catenin, E2f4, cell cycle, differentiation.
