

ЭНДОЦИТОЗНЫЙ ПУТЬ АЛЬФА-ФЕТОПРОТЕИНА В ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТКАХ КОСТНОГО МОЗГА МЫШЕЙ: МОЛЕКУЛЯРНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА И РОЛЬ В ИЗМЕНЕНИИ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ

Эндоцитозный путь альфа-фетопротейна (АФП) в трех различных по степени зрелости типах гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) костного мозга мышей являлся схожим по своей природе: его основу составлял рецептор-опосредованный транспорт, через мембранные р60, р65 и р305 рецепторы АФП, с клаатрин-зависимым механизмом образования рецепторосомы, в формировании которой участвуют комплексы AP-2, эндофилин и динамин. В изученных типах ГСК недеградированный АФП выявлялся в комплексе Гольджи, проникающий туда через слияние с ним образовавшейся рецепторосомы, а также в цитоплазме, эндоплазматическом ретикулуме и митохондриях предположительно посредством последовательного связывания с цитоплазматическими белками-распределителями – р55, р52, р62 и р67 рецепторами АФП, а также трансоргanelными белками-транспортерами – р147 и р182 рецепторами АФП. Исследование роли эндоцитоза АФП в изменении биологической активности изученных типов ГСК показало, что он непосредственно регулировал белок-синтетическую и метаболическую активности, а его влияние на другие изученные виды биологической активности являлось опосредованным через ERK1/2.

Ключевые слова: альфа-фетопротейн, костный мозг, гемопоэтические стволовые клетки, эндоцитоз, молекулярная характеристика, внутриклеточное распределение, изменение биологической активности, митоген-активируемые протеинкиназы.

Введение. Среди белков альбуминоидного семейства генов альфа-фетопротейн (АФП) является главным белком эмбриональной сыворотки, играющим ключевую роль в переносе многочисленных лигандов в эмбриональные ткани и клетки [1–4]. Специфическое взаимодействие и проникновение АФП выявлено в клетках всех эндо-, мезо- и эктодермальных тканей эмбриона и плода птиц и млекопитающих [1, 4]. При этом способность к специфическому эндоцитозу АФП является характеристи-

кой недифференцированных клеток и развивающихся тканей, в то время как дифференцированные клетки и сформировавшиеся ткани теряют такую способность при отсутствии внешних стимулов или внутренних изменений (неопластических трансформаций) [1, 4]. В частности выявлено, что АФП способен спонтанно связываться с гемопоэтическими стволовыми клетками (ГСК) костного мозга и проникать в них посредством эндоцитоза в условиях *in vitro* [5]. В то же время нормальные дифференцированные клетки крови в отсутствие митогена не способны к эндоцитозу АФП [6, 7].

В большинстве типов фетальных клеток АФП переносится через мембрану путем эндоцитоза при помощи специфических рецепторов на поверхности клеток [8–10], завершая цикл в рецепторосомах или лизосомах [9, 11]. Поглощенный в ходе эндоцитоза АФП также может выходить в цитозоль и распределяться по различным клеточным компартментам с участием аминокислотных сигнальных последовательностей цитоплазматических АФП-связывающих белков (АФП-СБ)/рецепторов [9–11].

Роль эндоцитозного пути транспорта АФП в недифференцированных клетках многогранна. Так, эндоцитозный путь является основным путем транспорта жизненно важных молекул, переносимых АФП [12, 13]. Внутриклеточный лиганд-ассоциированный АФП оказался способным к регуляции роста в нормальных репродуктивных тканях [14, 15]. Димеризованный внутриклеточный АФП имеет различные презумптивные сайты, за счет которых он потенциально способен оказывать значительное влияние на генную активность либо путем транспорта регуляторных компонентов (сигнальных молекул) для избирательного взаимодействия с определенными генами, либо выступая в роли сигнальной молекулы [3, 16, 17]. Аналогичным

образом АФП в цитозоле потенциально может выступать в качестве внутриклеточного регулятора биохимических процессов клетки [1, 3, 11, 16].

В наших предыдущих работах уже установлено прямое активирующее влияние АФП на биологическую активность ряда субфракций натуральных супрессорных клеток (NS-клеток) костного мозга мышей *in vitro*, которые по своему фенотипу относились к CD34⁺ клеткам [18]. Позднее из субфракций NS-клеток были выделены несколько субпопуляций CD34⁺ ГСК, различных по своему фенотипу, но демонстрирующих выраженный ответ на АФП в виде усиления таких их функций, как ростовая активность, клоногенная активность и дифференциация в условиях *in vitro* [19, 20].

В случае с ГСК костного мозга мышей на основании предварительных морфологических наблюдений эндоцитоза АФП [5] предположили наличие специфических систем поглощения АФП и его последующего внутриклеточного распределения. Кроме того, в ходе изучения механизмов АФП-зависимого изменения биологической активности ГСК костного мозга [21, 22] возник вопрос об участии эндоцитоза АФП в регуляции функций ГСК. Поэтому основными направлениями настоящей работы являлись молекулярная характеристика эндоцитозного пути АФП, анализ внутриклеточного распределения АФП и роль эндоцитозного пути в биологической активности трех различных по степени зрелости типов ГСК костного мозга мышей.

Материалы и методы. Во всех экспериментах использовали самцов мышей линии СВА возрастом 2,5–3,0 месяца и массой 20–22 г. Животные содержались в чистых (свободных от патогенов) условиях вивария Казахского НИИ онкологии и радиологии (г. Алматы) при температуре воздуха 22–25 °С, влажности 65–70 % и системе освещения «день–ночь». Карантинный и адаптационный период составлял 4 недели. Животные получали стандартные мышинные корма («Barastok», Австралия) и стерильную воду. Все процедуры с животными проводились в соответствии с национальными нормами использования лабораторных животных и нормами использования лабораторных животных Национального института

здоровья (Мерилэнд, США). Эвтаназию осуществляли цервикальной дислокацией после наркотизирования животных.

Костный мозг выделяли из бедренной и большой берцовой костей с помощью промывания их раствором для переноса клеток костного мозга («Sigma», США). Смыв собирали в стерильные 15 мл пластиковые контейнеры (BD Falcon, США) и ресуспендировали до получения гомогенной суспензии, которую затем центрифугировали при 200 g в течение 10 мин при 4 °С. Клеточный осадок ресуспендировали в среде Stemline II Methylcellulose Medium («Sigma», США). Клетки подсчитывали и оценивали процент жизнеспособных клеток при помощи включения раствора трипанового синего («Sigma», США). Во всех экспериментах использовали суспензии с процентом жизнеспособных клеток больше 90 %.

Полученную суспензию клеток костного мозга наслаивали на ступенчатый градиент плотности перколла («Sigma», США) со следующими плотностями ступенек: $\rho_1 = 1,13$ г/мл, $\rho_2 = 1,10$ г/мл, $\rho_3 = 1,090$ г/мл, $\rho_4 = 1,076$ г/мл, $\rho_5 = 1,060$ г/мл и $\rho_6 = 1,033$ г/мл [23–26]. Клетки центрифугировали при 2500 g в течение 20 мин при 4 °С. Клетки с плавучей плотностью $\rho = 1,090$ г/мл [20] собирали и отмывали центрифугированием при 300 g в 20-кратном объеме культуральной среды DMEM («Sigma», США) в течение 15 мин при 4 °С. Из полученной фракции клеток костного мозга выделяли чистую популяцию клеток CD34⁺ методом позитивной селекции с использованием коммерческих наборов реагентов CD34 MultiSort Kit («Miltenyi Biotec», Германия) согласно инструкции производителя. Затем из полученной популяции клеток CD34⁺ выделяли клетки CD133⁺ и CD117⁺ при помощи соответствующих наборов реагентов CD133 MicroBead Kit и CD117 MicroBead Kit (все от «Miltenyi Biotec», Германия) согласно инструкциям производителя. Клетки CD135⁺ выделяли из пула клеток CD34⁺ при помощи биотинилированного антитела к маркеру CD135 («eBioscience», США) и набора реагентов Anti-Biotin MultiSort Kit («Miltenyi Biotec», Германия) согласно инструкциям производителей. Чистоту выделенных типов ГСК контролировали при помощи проточной цитометрии (FACSCalibur, «BD Bioscience», США).

Во всех экспериментах использовали культуральную среду Stemline II Methylcellulose Medium, содержащую 4 мМ L-глутамин, 100 мг/мл стрептомицина и 100 Ед/мл пенициллина (все от «Sigma», США). Культивирование клеток осуществляли при температуре 37 °С, 5 % CO₂ и 95 % влажности.

Суспензии каждой субпопуляции ГСК с концентрацией $2 \cdot 10^7$ кл/мл в объеме 0,5 мл инкубировали с ¹²⁵I-меченным АФП (Институт ядерной физики, Казахстан) в конечной концентрации 50 мкг/мл с суммарной радиоактивностью 50 кБк при 37 °С в течение 180 мин. В ряде экспериментов использовали поликлональное антитело к АФП (анти-АФП) («Bioscience International», США), сывороточный альбумин (АЛБ), витамин D-связывающий белок (Вит D-СБ) и α-альбумин (α-АЛБ) (все от «Amersham», Швеция) в конечной концентрации 500 мкг/мл, которые вносили в клеточные суспензии одновременно с внесением ¹²⁵I-меченного АФП.

Суспензии ГСК отмывали холодным раствором забуференного физиологического раствора (0,15 М хлорида натрия/0,01 М фосфорнокислого двузамещенного натрия) и инкубировали 6 мин во льду с 0,7 мл раствора 0,2 М уксусной кислоты с рН 2,5, содержащего 0,5 М хлорида натрия (все от «Sigma», США). Клеточную суспензию осаждали и трижды отмывали холодным раствором забуференного физиологического раствора (0,15 М хлорида натрия/0,01 М фосфорнокислого двузамещенного натрия) на фильтре из стекловолокна («Sigma», США). Содержание ¹²⁵I-меченного АФП (имп/мин) определяли на жидкостном сцинтилляционном γ-счетчике (LS-6500 Liquid Scintillation Counter, Beckman Coulter, США).

Для выявления мембранных АФП-СБ/рецепторов, участвующих в эндоцитозе, суспензии каждой субпопуляции ГСК с концентрацией $2 \cdot 10^7$ кл/мл в объеме 0,5 мл инкубировали с АФП в конечной концентрации 50 мкг/мл в течение 180 мин. Клетки отмывали забуференным физиологическим раствором (0,15 М хлорида натрия/0,01 М фосфорнокислого двузамещенного натрия, t = 4 °С) и инкубировали 6 мин во льду с 0,7 мл раствора 0,2 М уксусной кислоты, рН 2,5, содержащего 0,5 М хлорида натрия. Клеточную суспензию осаж-

дали и трижды отмывали 4 °С тем же физиологическим раствором.

Фракцию ранних эндосом, комплекс Гольджи, эндоплазматический ретикулум (ЭПР) и митохондрии ГСК получали путем ультрацентрифугирования клеточных лизатов на сорбентах с использованием коммерческих наборов реагентов Endosoma Isolation Kit, Golgi Isolation Kit, Endoplasmic Reticulum Isolation Kit и Mitochondria Isolation Kit (все от «Sigma», США) согласно инструкциям производителя.

Белковые фракции органелл получали при помощи набора реагентов Protein Extraction & Labeling Kit («Clontech», США) согласно инструкции производителя.

Электрофорез с додецилсульфатом натрия (SDS) и нативный электрофорез проводили в полиакриламидном геле согласно протоколу Лэммли [23]. Концентрирующий гель состоял из 4 % полиакриламида в 0,375 М Трис-НСl буфере (рН 8,8) с добавлением 0,1 % персульфата аммония и 0,05 % TEMED (все от «Bio-Rad», США). При проведении электрофореза в состав геля добавляли 0,1 % SDS («Bio-Rad», США). Разделяющий гель являлся 4–20 % градиентным гелем, который готовили наслаиванием двух растворов акриламида с различным процентным содержанием, разведенных в 0,125 М Трис-НСl буфере (рН 6,8), который содержал 0,01 % SDS (при электрофорезе – 0,1 % SDS), 0,1 % персульфата аммония и 0,05 % TEMED. Состав верхнего электродного буфера (рН 8,3) включал 0,025 М Трис, 0,192 М глицина (все от «Bio-Rad», США) и 0,01 % SDS (при электрофорезе – 0,1 % SDS). Состав нижнего электродного буфера (рН 8,3) включал 0,025 М Трис и 0,192 М глицина.

При проведении электрофореза в состав буфера добавляли 0,1 % SDS. Образцы белков готовили в 0,0625 М Трис-НСl буфере (рН 6,8), включающем 10,0 % глицерина, 5,0 % меркаптоэтанола и 0,01 % бромфенолового синего (все от «Sigma», США). При проведении электрофореза в состав буфера добавляли 2,0 % SDS. Все вносимые в треки образцы содержали 25 мкг белка. Концентрирование белков осуществляли при 80 В и 100 мА, разделение белков – при 120 В и 200 мА.

Гель переносили на 0,2 мкм PVDF мембрану FluoroTrans W (Pall, США) с помощью ап-

парата для электропереноса белков (PROTEAN II Trans-Blot Cell, «Bio-Rad», США) согласно инструкции производителя.

PVDF мембрану 1 ч обрабатывали 3%-ным раствором яичного альбумина в фосфатном буфере (все от «Sigma», США) при 24 °С, затем трижды отмывали фосфатным буферным раствором и инкубировали в течение 3 ч при 37 °С с ¹²⁵I-меченным АФП в конечной концентрации 20 мкг/мл и суммарной радиоактивностью 20 кБк. Во всех экспериментах PVDF мембрану трижды отмывали фосфатно-солевым буфером.

Подсохшую мембрану укладывали в кассету с пленкой для регистрации X-лучей Kodak X-Omat Blue Autoradiography Film («Kodak», Япония). Распределение автордиографов АФП на пленке регистрировали при помощи системы

Таблица 1. Транспорт ¹²⁵I-меченного АФП во внутриклеточное пространство ГСК костного мозга в присутствии антитела против АФП и других представителей альбуминоидного семейства

Индукторы	¹²⁵ I-АФП, имп/мин · 10 ³
CD34 ⁺ 133 ⁺ 117 ⁻ 135 ⁻	
¹²⁵ I-АФП	2,7 ± 0,2
¹²⁵ I-АФП + анти-АФП	н/о
¹²⁵ I-АФП + АЛБ	2,6 ± 0,2
¹²⁵ I-АФП + Вит D-СБ	2,8 ± 0,3
¹²⁵ I-АФП + α-АЛБ	2,6 ± 0,1
CD34 ⁺ 133 ⁻ 117 ⁻ 135 ⁺	
¹²⁵ I-АФП	3,6 ± 0,2
¹²⁵ I-АФП + анти-АФП	н/о
¹²⁵ I-АФП + АЛБ	3,7 ± 0,2
¹²⁵ I-АФП + Вит D-СБ	3,5 ± 0,2
¹²⁵ I-АФП + α-АЛБ	3,6 ± 0,1
CD34 ⁺ 133 ⁻ 117 ⁺ 135 ⁻	
¹²⁵ I-АФП	4,9 ± 0,2
¹²⁵ I-АФП + анти-АФП	н/о
¹²⁵ I-АФП + АЛБ	5,0 ± 0,2
¹²⁵ I-АФП + Вит D-СБ	4,8 ± 0,2
¹²⁵ I-АФП + α-АЛБ	4,9 ± 0,2

Примечание. ¹²⁵I-АФП – ¹²⁵I-меченный альфа-фетопrotein; анти-АФП – поликлональное антитело против АФП; АЛБ – сывороточный альбумин; Вит D-СБ – витамин D, связывающий белок; α-АЛБ – α-альбумин; н/о – не обнаружено.

документирования (Polaroid Gel Documentation System, «Bio-Rad», США).

Ингибиторный анализ компонентов эндоцитозного транспорта АФП осуществляли следующим образом. Суспензии каждой субпопуляции ГСК с концентрацией 2 · 10⁶ кл/мл в объеме 0,5 мл инкубировали с ¹²⁵I-меченным АФП в конечной концентрации 50 мкг/мл с суммарной радиоактивностью 50 кБк при 37 °С в течение 180 мин. В ряде экспериментов клетки предварительно инкубировали 6 ч в присутствии 2 · 10⁻³ М филипина («Sigma», США), 10⁻³ амантадина хлорида («Sigma», США), 10⁻³ М цитохалазина D («Sigma», США), 5,5 · 10⁻⁴ М стауроспорина («Sigma», США), 8,0 · 10⁻³ М N'-циклогексиметиленициклогексанкарбогидазида (N'-ЦЦК) (Институт химических наук, Казахстан), 3,0 · 10⁻⁵ М динасора («Santa Cruz Biotechnology», США), 2,0 · 10⁻⁵ М ингибитора CI-976 («GlaxoSmithKline Pharmaceuticals», ОК) или 4,5 · 10⁻³ М ингибитора Eox1 («Tocris Bioscience», США), а также некоторых их комбинаций.

Цитоплазматические и ядерные экстракты ГСК извлекали при помощи набора реагентов NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents («Thermo Scientific», США) согласно инструкции производителя. После выделения клеточные экстракты диализовали против фосфатного буфера в течение 48 ч при 5 °С. Для конечной очистки белков от солевых примесей использовали набор реагентов RAGprep Protein Clean-Up and Enrichment Kit («Thermo Scientific», США). После конечной очистки экстракты лиофилизировали под вакуумом и хранили при -86 °С.

Для оценки пролиферативной активности суспензии ГСК рассеивали в 2 мл флаконы («Sigma», США) в объеме 100 мкл и доводили до концентрации 2 · 10⁶ клеток/мл культуральной средой, содержащей индуктор. В качестве индуктора использовали АФП («Хема-Medica», РФ), конечная концентрация которого в клеточной суспензии составляла 50 мкг/мл. В ряде экспериментов перед добавлением АФП к суспензиям клеток их предварительно 6 ч культивировали в присутствии 10⁻³ М амантадина хлорида или 2,5 · 10⁻⁷ М ингибитора ERK1nh («Calbiochem», ОК), а также их комбинации. Отрицательным контролем во всех экспериментах

являлся раствор Хенкса («Sigma», США). Время воздействия АФП составляло 3 ч. По окончании индукции клетки отмывали центрифугированием, клеточный осадок ресуспендировали в культуральной среде и рассеивали в 96-луночные круглодонные планшеты («BD Falcon», США) в количестве $5 \cdot 10^5$ клеток в ячейку. Планшеты инкубировали 48 ч. За 30 мин до окончания инкубации в суспензию клеток добавляли 20 мкМ бромдиоксиуридина. Изучение уровня синтеза ДНК субпопуляций ГСК осуществляли с использованием коммерческого набора реагентов APC BrdU Flow Kit («BD Bioscience», США) при помощи проточной цитометрии (FACSCalibur, «BD Bioscience», США). Количественной характеристикой пролиферативной активности ГСК являлся индекс пролиферации (ИП), вычисляемый по формуле

$$\text{ИП} = [(F_{\text{оп}}/F_{\text{контр}}) - 1] \cdot 100 \%, \quad (1)$$

где $F_{\text{оп}}$ – относительное значение флуоресценции BrdU-позитивных клеток при наличии индуктора, $F_{\text{контр}}$ – в отрицательном контроле.

Изучение интенсивности общего синтеза белка в ГСК проводили по методу определения включения радиоактивно меченых аминокислот в клетки монослоя [27]. Для этого суспензии ГСК рассеивали в 48-луночные плоскодонные планшеты («BD Falcon», США) в количестве $5 \cdot 10^5$ клеток в ячейку. В качестве индуктора использовали раствор АФП в конечной концентрации 50 мкг/мл. В ряде экспериментов перед добавлением АФП к суспензиям клеток их предварительно культивировали в течение 6 ч в присутствии 10^{-3} М амантадина хлорида или $2,5 \cdot 10^{-7}$ М ингибитора ERK1nh, а также их комбинации. Отрицательным контролем во всех экспериментах являлся раствор Хенкса. Время воздействия АФП составляло 3 ч. По окончании инкубации супернатант удаляли, клетки отмывали центрифугированием, клеточный осадок ресуспендировали в новой культуральной среде и инкубировали еще 48 ч. В конце восстановительного периода в каждую лунку добавляли 75 кБк $^3\text{H-Leu}$ («Amersham», Швеция), инкубировали в течение 3 ч, после чего клетки промывали культуральной средой, фиксировали метанолом («Sigma», США) и инкубировали 48 ч при 4 °С. По истечении срока инкубации ячейки последовательно четырехкрат-

но промывали 10%-ным раствором трихлоруксусной кислоты («Sigma», США) и метанолом. После финальной промывки в каждую ячейку добавляли 1 н раствор гидроксида натрия («Sigma», США) и инкубировали 8 ч при 5 °С. Из каждой ячейки изымали аликвоту и добавляли во флаконы со сцинтиллятором («Beckman Coulter», США). Содержание $^3\text{H-Leu}$ (имп/мин) определяли на жидкостном сцинтилляционном γ -счетчике (LS 6500 Liquid Scintillation Counter, «Beckman Coulter», США). Количественным показателем общего уровня синтеза белка ГСК являлся индекс белок-синтетической активности (ИБСА), вычисляемый по формуле

$$\text{ИБСА} = [(^3\text{H-Leu}_{\text{оп}}/^3\text{H-Leu}_{\text{контр}}) - 1] \cdot 100 \%, \quad (2)$$

где $^3\text{H-Leu}_{\text{оп}}$ – значение включения радиоактивной метки (имп/мин) при наличии индуктора, $^3\text{H-Leu}_{\text{контр}}$ – в отрицательном контроле.

Суспензии ГСК для оценки общей метаболической активности рассеивали в 48-луночные плоскодонные планшеты ($5 \cdot 10^5$ клеток в каждую ячейку). В качестве индуктора использовали АФП, конечная концентрация которого в клеточной суспензии составляла 50 мкг/мл. В ряде экспериментов перед добавлением АФП к суспензиям клеток их предварительно культивировали 6 ч в присутствии 10^{-3} М амантадина хлорида или $2,5 \cdot 10^{-7}$ М ингибитора ERK1nh, а также их комбинации. Отрицательным контролем во всех экспериментах являлся раствор Хенкса. Время воздействия АФП составляло 18 ч. Общую метаболическую активность клеток анализировали спектрофотометрическим методом с использованием коммерческого набора реагентов Cell Proliferation Reagent WST-1 («Roche Diagnostics», США) при помощи микропланшетного ридера (Sunrise RC.4, «Tecan», Австрия) согласно инструкции производителя. Количественным показателем общего уровня метаболизма ГСК являлся индекс метаболической активности (ИМА), вычисляемый по формуле

$$\text{ИМА} = [(A_{\text{оп}}/A_{\text{контр}}) - 1] \cdot 100 \%, \quad (3)$$

где $A_{\text{оп}}$ – значение оптической плотности при наличии индуктора; $A_{\text{контр}}$ – в отрицательном контроле.

При оценивании общей клоногенной активности суспензии ГСК доводили до кон-

Таблица 2. Транспорт ^{125}I -меченного АФП во внутриклеточное пространство ГСК костного мозга в присутствии ингибиторов кавеолина, клатрина и актина

Индукторы	^{125}I -АФП, имп/мин · 10 ³
CD34 ⁺ 133 ⁺ 117 ⁻ 135 ⁻	
^{125}I -АФП	2,5 ± 0,2
Филипин + ^{125}I -АФП	2,6 ± 0,2
Амантадина хлорид + ^{125}I -АФП	н/о
Цитохалазин D + ^{125}I -АФП	2,7 ± 0,2
CD34 ⁺ 133 ⁻ 117 ⁻ 135 ⁺	
^{125}I -АФП	3,6 ± 0,3
Филипин + ^{125}I -АФП	3,7 ± 0,2
Амантадина хлорид + ^{125}I -АФП	н/о
Цитохалазин D + ^{125}I -АФП	3,4 ± 0,3
CD34 ⁺ 133 ⁻ 117 ⁺ 135 ⁻	
^{125}I -АФП	5,1 ± 0,4
Филипин + ^{125}I -АФП	4,8 ± 0,2
Амантадина хлорид + ^{125}I -АФП	0,1 ± 0,2*
Цитохалазин D + ^{125}I -АФП	5,2 ± 0,3

Примечание. ^{125}I -АФП – ^{125}I -меченный альфа-фетопротейн; н/о – не обнаружено. * Здесь и в табл. 3–6 достоверность результатов в сравнении с эффектом ^{125}I -меченного АФП в отсутствие ингибитора $P < 0,05$.

Таблица 3. Транспорт ^{125}I -меченного АФП во внутриклеточное пространство ГСК костного мозга в присутствии ингибиторов белкового комплекса AP и β-аррестина

Индукторы	^{125}I -АФП, имп/мин · 10 ³
CD34 ⁺ 133 ⁺ 117 ⁻ 135 ⁻	
^{125}I -АФП	2,6 ± 0,2
Стауроспорин + ^{125}I -АФП	н/о
N'-ЦЦК + ^{125}I -АФП	2,5 ± 0,1
CD34 ⁺ 133 ⁻ 117 ⁻ 135 ⁺	
^{125}I -АФП	3,7 ± 0,2
Стауроспорин + ^{125}I -АФП	0,1 ± 0,2*
N'-ЦЦК + ^{125}I -АФП	3,5 ± 0,5
CD34 ⁺ 133 ⁻ 117 ⁺ 135 ⁻	
^{125}I -АФП	5,0 ± 0,3
Стауроспорин + ^{125}I -АФП	0,1 ± 0,2*
N'-ЦЦК + ^{125}I -АФП	4,9 ± 0,3

Примечание. ^{125}I -АФП – ^{125}I -меченный альфа-фетопротейн; N'-ЦЦК – N'-(циклогексиметилен)циклогексанкарбогидазид; н/о – не обнаружено.

центрации $2 \cdot 10^5$ клеток/мл культуральной средой IMDM («Sigma», США), содержащей 2 % фетальной телячьей сыворотки. Затем суспензию клеток смешивали со средой MACS HSC-CFU Basic («Miltenyi Biotec», Германия), содержащей АФП (конечная концентрация 50 мкг/мл) в соотношении 1 : 10. В ряде экспериментов перед добавлением АФП к суспензиям клеток их предварительно культивировали 6 ч в присутствии 10^{-3} М амантадина хлорида или $2,5 \cdot 10^{-7}$ М ингибитора ERK1nh, а также их комбинации. Отрицательным контролем во всех экспериментах являлся раствор Хенкса. Все процедуры с суспензиями ГСК проводили согласно протоколу производителя среды MACS HSC-CFU Basic. Оценку и подсчет количества колоний (> 50 клеток) и кластеров (< 50 клеток) осуществляли *in situ* через 14 дней с помощью микроскопии (Olympus IX81, Япония). Количественным показателем общей клоногенной активности ГСК являлся индекс клоногенной активности (ИКА), вычисляемый по формуле

$$\text{ИКА} = [(N_{\text{оп}}/N_{\text{контр}}) - 1] \cdot 100 \%, \quad (4)$$

где $N_{\text{оп}}$ – абсолютное количество кластеров и колоний в присутствии индуктора; $N_{\text{контр}}$ – в отрицательном контроле.

Иммуносупрессорную активность ГСК оценивали по влиянию секретлируемых ими супрессорных факторов на пролиферацию мононуклеарных клеток селезенки мыши, стимулированных фитогемагглютинином М [28]. Для этого суспензию ГСК рассеивали в концентрации $2 \cdot 10^6$ кл/мл в 2-миллиметровые круглодонные флаконы и культивировали в присутствии АФП (конечная концентрация 50 мкг/мл). В ряде экспериментов перед добавлением АФП к суспензиям клеток их предварительно 6 ч культивировали в присутствии 10^{-3} М амантадина хлорида или $2,5 \cdot 10^{-7}$ М ингибитора ERK1nh, а также их комбинации. Отрицательным контролем во всех экспериментах являлся раствор Хенкса. Время воздействия АФП составляло 3 ч. После инкубации их отмывали центрифугированием и инкубировали еще 48 ч. Супернатанты отбирали и тестировали на культуре мононуклеарных клеток селезенки, которую рассеивали в 96-луночные круглодонные планшеты («BD Falcon», США) в количестве $5 \cdot 10^5$ клеток на ячейку в присутствии куль-

туральных супернатантов ГСК (200 мкл) и фитогемагглютинина М (конечная концентрация 20 мкг/мл) («Sigma», США). Планшеты инкубировали 48 ч. За 30 мин до окончания инкубации в суспензию клеток добавляли 20 мкМ бромдиоксиуридина. Изучение уровня синтеза ДНК суспензии мононуклеарных клеток проводили с использованием коммерческого набора реагентов APC BrdU Flow Kit при помощи проточной цитометрии (FACSCalibur, «BD Bioscience», США). Количественной характеристикой общей иммуносупрессорной активности ГСК являлся индекс иммуносупрессорной активности (ИИА), вычисляемый по формуле

$$\text{ИИА} = [(F_{\text{оп}}/F_{\text{контр}}) - 1] \cdot 100 \%, \quad (6)$$

где $F_{\text{оп}}$ – относительное значение флюоресценции BrdU-позитивных клеток при наличии культурального супернатанта ГСК, $F_{\text{контр}}$ – при отсутствии культурального супернатанта ГСК.

Для определения количественного содержания активной формы ERK1/2 киназы выделенные ГСК ресуспендировали в культуральной среде (концентрация 10^7 клеток/мл), куда в качестве индуктора добавляли раствор АФП в конечной концентрации 50 мкг/мл. В ряде экспериментов перед добавлением АФП к суспензиям клеток их предварительно 6 ч культивировали в присутствии $3,0 \cdot 10^{-5}$ М динасора. Время воздействия АФП составляло 3 ч. Уровень активированной (фосфорилированной) формы ERK1 в цитоплазматических экстрактах ГСК определяли при помощи набора реагентов Phospho-ERK1/ERK2 DuoSet IC ELISA Kit («R&D Systems», США) согласно инструкции производителя.

Качественные анализы проводили в трех независимых экспериментах в одной повторности, количественные – в трехкратной повторности в трех независимых экспериментах. Для всех численных данных высчитывали среднее арифметическое значение (М) и стандартную ошибку среднего (SEM). Для расчета достоверности различия количественных показателей использовали t-критерий Стьюдента. Достоверными считали различия при $P < 0,05$.

Результаты исследований. Молекулярные составляющие эндоцитозного пути альфа-фетопroteина. На первом этапе проанализировали тип

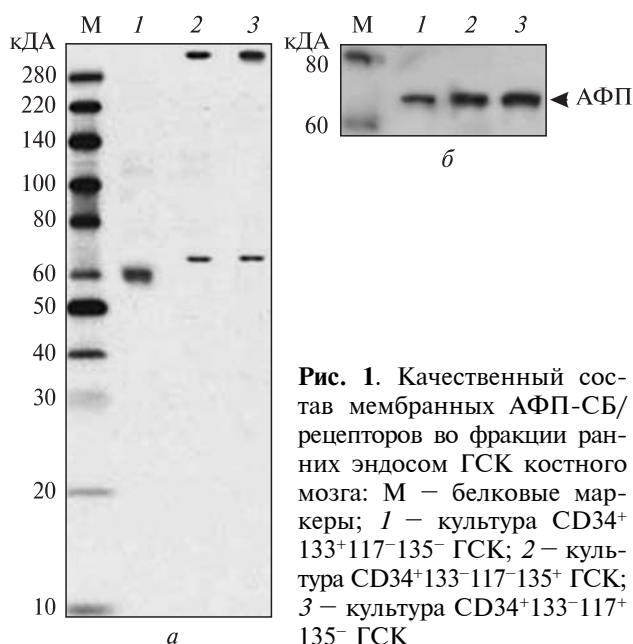


Рис. 1. Качественный состав мембранных АФП-СБ/рецепторов во фракции ранних эндосом ГСК костного мозга: М – белковые маркеры; 1 – культура CD34⁺133⁺117⁻135⁻ ГСК; 2 – культура CD34⁺133⁻117⁻135⁺ ГСК; 3 – культура CD34⁺133⁻117⁺135⁻ ГСК

Таблица 4. Транспорт ¹²⁵I-меченного АФП во внутриклеточное пространство ГСК костного мозга в присутствии ингибиторов динамина и эндофилина

Индукторы	¹²⁵ I-АФП, имп/мин · 10 ³
CD34 ⁺ 133 ⁺ 117 ⁻ 135 ⁻	
¹²⁵ I-АФП	2,7 ± 0,2
Динасор + ¹²⁵ I-АФП	0,8 ± 0,1*
СИ-976 + ¹²⁵ I-АФП	1,7 ± 0,1*
Динасор + СИ-976 + ¹²⁵ I-АФП	н/о
CD34 ⁺ 133 ⁻ 117 ⁻ 135 ⁺	
¹²⁵ I-АФП	3,6 ± 0,3
Динасор + ¹²⁵ I-АФП	1,0 ± 0,1
СИ-976 + ¹²⁵ I-АФП	2,2 ± 0,3
Динасор + СИ-976 + ¹²⁵ I-АФП	н/о
CD34 ⁺ 133 ⁻ 117 ⁺ 135 ⁻	
¹²⁵ I-АФП	5,1 ± 0,3
Динасор + ¹²⁵ I-АФП	1,2 ± 0,2
СИ-976 + ¹²⁵ I-АФП	2,1 ± 0,2
Динасор + СИ-976 + ¹²⁵ I-АФП	н/о

Примечание. ¹²⁵I-АФП – ¹²⁵I-меченный альфа-фетопroteин; н/о – не обнаружено.

эндоцитоза АФП в изучаемых ГСК. В результате выявили, что одновременное введение ¹²⁵I-меченного и десятикратного избытка анти-АФП привело к полному подавлению эндоцитоза АФП в цитозоль всех изучаемых субпо-

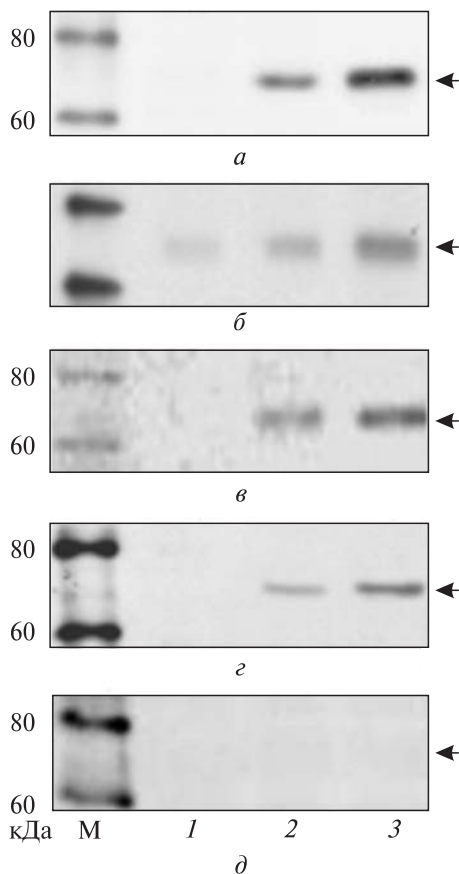


Рис. 2. Распределение внутриклеточного ^{125}I -меченного АФП (стрелки) в субпопуляциях ГСК костного мозга: *a* – цитоплазматическая белковая фракция; *б* – белковая фракция комплекса Гольджи; *в* – белковая фракция митохондрий; *г* – белковая фракция эндоплазматического ретикулума; *д* – нуклео-плазматическая белковая фракция; М – белковые маркеры; 1 – $\text{CD34}^+\text{133}^+\text{117}^-\text{135}^-$ ГСК; 2 – $\text{CD34}^+\text{133}^-\text{117}^-\text{135}^+$ ГСК; 3 – культура $\text{CD34}^+\text{133}^-\text{117}^+\text{135}^-$ ГСК

пуляций ГСК (табл. 1), т.е. поликлональное антитело против АФП (анти-АФП) блокировало эпитопы ^{125}I -меченного АФП и тем самым препятствовало его взаимодействию с соответствующим АФП-СБ/рецептором на плазматической мембране ГСК, что в результате привело к блокаде эндоцитоза ^{125}I -меченного АФП в цитозоль ГСК. При этом использование 10-кратного избытка немеченых АЛБ, Вит D-СБ или α -АЛБ не приводило к подобному ингибированию эндоцитоза ^{125}I -меченного АФП (табл. 1). Следовательно, эндоцитозный путь транспорта АФП

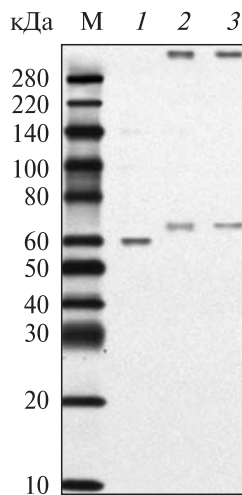


Рис. 3. Качественный состав мембранных АФП-СБ/рецепторов в комплексе Гольджи ГСК костного мозга: М – белковые маркеры; 1 – $\text{CD34}^+\text{133}^+\text{117}^-\text{135}^-$ ГСК; 2 – $\text{CD34}^+\text{133}^-\text{117}^-\text{135}^+$ ГСК; 3 – $\text{CD34}^+\text{133}^-\text{117}^+\text{135}^-$ ГСК

в изучаемых типах ГСК является рецептор-опосредуемым, в основе которого лежит специфическое взаимодействие АФП с его АФП-СБ/рецептором на плазматической мембране ГСК.

Выявление АФП-СБ/рецептора, участвующего в рецептор-опосредованном эндоцитозе АФП в изучаемых типах ГСК, показало, что такими белками являются р60 АФП-СБ мембраны $\text{CD34}^+\text{133}^+\text{117}^-\text{135}^-$ ГСК, а также р305 и р65 АФП-СБ мембраны $\text{CD34}^+\text{133}^-\text{117}^+\text{135}^-$ и $\text{CD34}^+\text{133}^-\text{117}^-\text{135}^+$ ГСК [29], поскольку именно эти белки обнаруживались во фракции ранних эндосом после инкубации клеток с АФП вместе с нативным (нефрагментированным) АФП (рис. 1).

После выявления типа эндоцитозного транспорта АФП в цитозоль ГСК изучали его разновидность по природе везикулообразующего белка. В ходе исследования проанализирована роль в ингибиторной модели трех основных видов везикулообразующих белков – кавеолина, клатрина и актина. В результате установлено, что преинкубация ГСК с ингибитором клатрина (амантадина хлорид) привела к полному подавлению трансмембранного транспорта ^{125}I -меченного АФП в цитозоль всех изучаемых субпопуляций (табл. 2). Что касается других белков, то в присутствии ингибиторов кавеолина (филипин) или актина (цитохалазин D) трансмембранный транспорт ^{125}I -меченного АФП достоверно не отличался от транспорта АФП в отсутствие ингибиторов (табл. 2). Это свидетельствует о том, что рецептор-опосредо-

ванный эндоцитоз АФП в изучаемых субпопуляциях ГСК по своей разновидности является клатрин-зависимым.

На третьем этапе исследовали молекулярные составляющие клатрин-зависимого эндоцитозного транспорта АФП в цитозоль ГСК. Так, анализ основных адаптерных белков (АР) клатрин-зависимого эндоцитоза АФП, которые ответственны за взаимодействие с АФП-СБ/рецептором и последующую инициацию формирования везикулы, показал, что таким белком является белковый комплекс АР-2, так как использование его ингибитора (стауроспорин) приводило к 100%-ному подавлению рецептор-зависимого трансмембранного транспорта ^{125}I -меченного АФП в цитозоль всех субпопуляций ГСК, в то время как применение ингибитора β -аррестина (N^{t} -(циклогексиметил) циклогексанкарбогидазида) достоверно не изменяло содержание внутриклеточного ^{125}I -меченного АФП (табл. 3).

Анализ основных белков, принимающих участие в инвагинации и отделении везикулы, а также образовании ранней эндосомы, показал, что основную роль в этих процессах играет динамин, так как применение его ингибитора (динасор) приводило более чем к 70%-ному подавлению рецептор-зависимого трансмембран-

ного транспорта ^{125}I -меченного АФП в цитозоль всех субпопуляций ГСК (табл. 4). Преинкубация клеток с ингибитором эндофилина (СИ-976) характеризовалась подавлением рецептор-зависимого трансмембранного транспорта ^{125}I -меченного АФП в цитозоль изучаемых типов ГСК не более 40 % (табл. 4). Это говорит о том, что эндофинин является вторым белком, участвующим в формировании везикулы и образовании эндосомы, дополняющим действие динамина. При этом одновременное использование динасора и ингибитора СИ-976 приводило к полному подавлению трансмембранного транспорта ^{125}I -меченного АФП в цитозоль изучаемых субпопуляций ГСК (табл. 4), указывая на зависимость инвагинации участка мембраны с комплексом АФП/АФП-СБ и отделения везикулы, а также образования ранней эндосомы только от двух упомянутых белков.

Внутриклеточное распределение альфа-фетопротеина. После выявления природы и молекулярных компонентов эндоцитозного транспорта АФП было изучено его внутриклеточное распределение в ГСК. Так, нативный (нефрагментированный) АФП выявлялся в комплексе Гольджи всех изучаемых субпопуляций. В $\text{CD}34^+133^-117^-135^-$ и $\text{CD}34^+133^-117^-135^+$ ГСК нефрагментированный АФП выявлялся также

Таблица 5. АФП-индуцированное изменение биологической активности ГСК костного мозга в присутствии ингибитора клатрина

Индукторы	Функциональная активность ГСК, %				
	ИП	ИБСА	ИМА	ИКА	ИИА
	$\text{CD}34^+133^+117^-135^-$				
АФП	73,2 ± 4,3	120,7 ± 10,0	140,9 ± 8,7	194,5 ± 11,3	42,8 ± 1,2
Амантадина хлорид + АФП	70,2 ± 5,8	112,5 ± 9,7	132,9 ± 10,3	186,6 ± 14,3	40,2 ± 2,1
	$\text{CD}34^+133^-117^-135^+$				
АФП	83,6 ± 9,2	78,4 ± 5,3	167,9 ± 19,3	170,7 ± 11,9	34,6 ± 2,8
Амантадина хлорид + АФП	63,7 ± 5,7 *	59,5 ± 4,5 *	110,8 ± 12,4 *	115,4 ± 16,3 *	26,8 ± 2,6 *
	$\text{CD}34^+133^-117^+135^-$				
АФП	45,9 ± 3,4	84,6 ± 9,3	97,4 ± 8,2	131,8 ± 10,5	27,5 ± 2,4
Амантадина хлорид + АФП	35,8 ± 2,6 *	47,9 ± 3,6 *	49,3 ± 3,7 *	69,7 ± 7,3 *	20,2 ± 1,6 *

Примечание. АФП – альфа-фетопротеин; ИП – индекс пролиферации; ИБСА – индекс белок-синтетической активности; ИМА – индекс метаболической активности; ИКА – индекс клоногенной активности; ИИА – индекс иммуносупрессорной активности.

в цитоплазме, ЭПР и митохондриях (рис. 2). Что касается нуклеоплазмы ГСК, то там АФП не обнаружен ни в одной из изучаемых субпопуляций (рис. 2).

Появление АФП в комплексе Гольджи обусловлено пассивной миграцией АФП-содержащей эндосомы в его структуру, так как в составе его белковой фракции выявлены АФП-СБ/рецепторы, принимающие участие в эндоцитозном транспорте АФП в цитозоль ГСК, а именно р305, р65 и р60 АФП-СБ мембраны (рис. 3).

Анализ состояния АФП в цитоплазме CD34⁺133⁻117⁺135⁻ и CD34⁺133⁻117⁻135⁺ ГСК показал, что он существует в цитозоле в двух формах — свободной и связанной. Так, ¹²⁵I-меченный АФП выявлялся в ходе нативного электрофореза белковых фракций цитоплазмы в виде нескольких белковых бандов с различной молекулярной массой: 65–68 кДа (свободный АФП), 125–130, 210–220 и 255–260 кДа (связанный АФП) в CD34⁺133⁻117⁺135⁻ СК, а также 65–68 кДа (свободный АФП), 130–135 и 225–230 кДа (связанный АФП) в CD34⁺133⁻117⁻135⁺ ГСК (рис. 4, а). Эти высокомолекулярные белковые банды полностью соответствуют по своей молекулярной массе бандам, выявляемым в результате нативного электрофореза смеси ¹²⁵I-меченного АФП (60 мкг/мл) и выделенных АФП-СБ/рецепторов цитоплазмы (по 20 мкг/мл каждого белка) CD34⁺133⁻117⁺135⁻ и CD34⁺133⁻117⁻135⁺ ГСК [30], предварительно проинкубированной в течение 3 ч при 37 °С (рис. 4, б). Это свидетельствует о том,

Таблица 6. Содержание активной формы ERK1/2 в цитоплазме АФП-индуцированных ГСК костного мозга в присутствии ингибитора динамина

Индукторы	ERK1/2, ед/мл
CD34 ⁺ 133 ⁺ 117 ⁻ 135 ⁻	
АФП	40,7 ± 4,2
Динасор + АФП	38,7 ± 3,5
CD34 ⁺ 133 ⁻ 117 ⁻ 135 ⁺	
АФП	43,2 ± 3,0
Динасор + АФП	36,7 ± 2,4*
CD34 ⁺ 133 ⁻ 117 ⁺ 135 ⁻	
АФП	31,0 ± 2,4
Динасор + АФП	23,2 ± 1,9*

что ¹²⁵I-меченный АФП в цитоплазме ГСК при его выходе из эндосомы в цитоплазму вступает во взаимодействие с р52, р62, р67 и р182 АФП-СБ CD34⁺133⁻117⁺135⁻ ГСК, а также р55 и р147 АФП-СБ CD34⁺133⁻117⁻135⁺ ГСК. Необходимо отметить, что такое взаимодействие носит обратимый характер, так как в ходе проведения SDS-электрофореза тех же белковых фракций цитоплазмы CD34⁺133⁻117⁺135⁻ и CD34⁺133⁻117⁻135⁺ ГСК выявлялась только одна фракция ¹²⁵I-меченного АФП — свободная (рис. 4, в).

Изучение транспорта АФП в ЭПР CD34⁺133⁻117⁺135⁻ и CD34⁺133⁻117⁻135⁺ ГСК показало, что он осуществляется не за счет образования вторичной эндосомы в комплексе Гольджи при помощи белков COP, а посредством слияния рецепторосомы с комплексом, так как ингибирование белков COP не приводит к изменению содержания ¹²⁵I-меченного АФП в составе белковой фракции ЭПР (рис. 5).

Роль эндоцитозного пути АФП в изменении биологической активности. На первом этапе изучали участие рецептор-опосредованного эндоцитоза в АФП-индуцированном изменении различных функций ГСК. В результате установили, что преинкубация CD34⁺133⁺117⁻135⁻ ГСК с ингибитором клатрина (амантадином хлоридом) не приводила к достоверным изменениям всех изучаемых функций (табл. 5). Следовательно, рецептор-зависимый эндоцитоз АФП в CD34⁺133⁺117⁻135⁻ ГСК не участвует во внутриклеточной регуляции их функций. В противоположность этому обработка CD34⁺133⁻117⁺135⁻ и CD34⁺133⁻117⁻135⁺ ГСК амантадином хлоридом характеризовалась достоверным подавлением всех изучаемых функций в среднем на 25 и 56 % соответственно (табл. 5). Это свидетельствует о том, что рецептор-опосредованный эндоцитоз вовлечен в регуляцию биологической активности упомянутых типов ГСК в ходе их взаимодействия с АФП.

На втором этапе изучали влияние динамина на АФП-зависимую активацию ERK1/2 киназы в цитозоле изученных типов ГСК. В итоге установили, что ингибитор динамина (динасор) не оказывал влияния на процесс активации ERK1/2 в CD34⁺133⁺117⁻135⁻ ГСК. В то же время обработка CD34⁺133⁻117⁺135⁻ и CD34⁺133⁻117⁻135⁺ ГСК динасором приводила к достоверному подавлению активации ERK1/2

на 15 и 20 % соответственно (табл. 6), а это говорит о том, что рецептор-опосредованный эндоцитоз является регулятором активности ERK1/2 киназы в цитоплазме перечисленных типов ГСК при контакте с АФП.

На третьем этапе изучали влияние рецептор-опосредованного эндоцитоза на ERK1/2-опосредованную регуляцию изменения биологической активности CD34⁺133⁻117⁺135⁻ и CD34⁺133⁻117⁻135⁺ ГСК под воздействием АФП. В результате одновременного использования амантадина хлорида и ингибитора ERK1/2 (ERK1Inh) установили достоверное снижение белок-синтетической и метаболической активности в обоих типах АФП-индуцированных ГСК по сравнению с эффектом ERK1Inh (табл. 7). Что касается других видов биологической активности, то присутствие амантадина хлорида не влияло на действие ингибитора ERK1Inh. Следовательно, рецептор-опосредованный эндоцитоз лишь отчасти напрямую ответствен за внутриклеточную регуляцию биологической активности ГСК, а именно за регуляцию белок-синтетической и метаболической активности, в то время как его влияние на пролиферативную клоногенную и иммуносупрессорную активность является опосредованным через ERK1/2-зависимый сигнальный каскад.

Обсуждение полученных данных. Ранее нами установлено наличие эндоцитозного пути АФП в изученных типах ГСК костного мозга мышей при их культивировании *in vitro* [5]. Результаты, полученные в настоящем исследовании, раскрывают молекулярные составляющие эндоцитоза и распределения АФП, а также роль эндоцитоза АФП в биологической активности трех различных по степени зрелости типах ГСК костного мозга мышей и, возможно, других типах ГСК костного мозга и пуповинной крови, а также стволовых клеток печени.

Для таких полипептидов, как АФП, возможно существование четырех типов эндоцитозного транспорта: 1) пассивный эндоцитоз через клеточную мембрану посредством фагоцитоза; 2) пассивный эндоцитоз через клеточную мембрану посредством микропиноцитоза; 3) активный эндоцитоз через встроенный в плазматическую мембрану АТФ-зависимый рецептор – порин; 4) активный эндоцитоз через клеточную мембрану посредством рецептор-зависи-

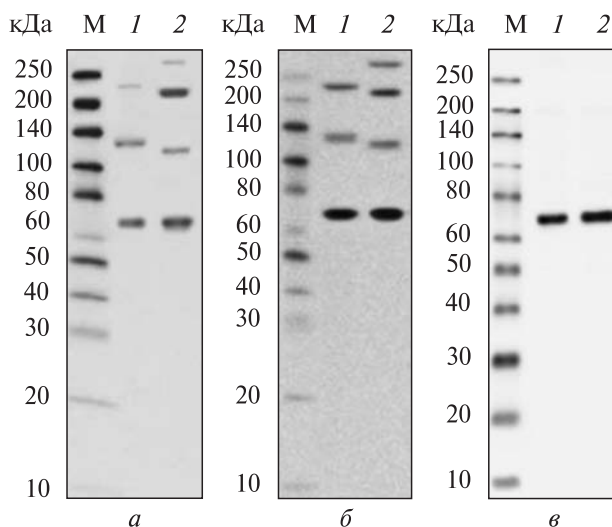


Рис. 4. Взаимодействие ¹²⁵I-меченного АФП с АФП-СБ/рецепторами цитоплазмы ГСК костного мозга: *а* – выявление ¹²⁵I-меченного АФП в цитоплазме в ходе нативного электрофореза белковой фракции цитоплазмы; *б* – выявление взаимодействия ¹²⁵I-меченного АФП с АФП-СБ/рецепторами цитоплазмы в условиях *in vitro* в ходе нативного электрофореза; *в* – выявление ¹²⁵I-меченного АФП в цитоплазме в ходе SDS электрофореза белковой фракции цитоплазмы; М – белковые маркеры; 1 – CD34⁺133⁻117⁺135⁻ ГСК; 2 – CD34⁺133⁻117⁺135⁻ ГСК

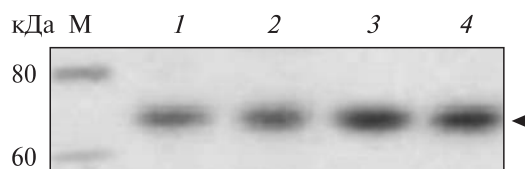


Рис. 5. Выявление АФП (стрелка) в ЭПР ГСК костного мозга в присутствии ингибитора COP белков: М – белковые маркеры; 1 – CD34⁺133⁻117⁺135⁺ ГСК в отсутствие ингибитора Eox1; 2 – CD34⁺133⁻117⁻135⁺ ГСК в присутствии ингибитора Eox1; 3 – CD34⁺133⁻117⁺135⁻ ГСК в отсутствие ингибитора Eox1; 4 – культура CD34⁺133⁻117⁺135⁻ ГСК в присутствии ингибитора Eox1

мого эндоцитоза [31, 32]. Последний способ является наиболее вероятным, поскольку ни один из мембранных АФП-СБ изучаемых типов ГСК не фосфорилировался [33] и именно данный механизм эндоцитозного пути АФП является наиболее распространенным в его клетках-мишенях [1, 9–11]. Исследование типа эндо-

цитозного транспорта АФП в изученных типах ГСК костного мозга выявило, что им является рецептор-опосредованный путь трансмембранного транспорта, который наиболее широко распространен в его клетках-мишенях, в частности в эмбриональных клетках эндодермы, эмбриональных фибробластах, клетках фетальной печени, лимфоидных предшественниках и других типах клеток фетальных тканей [1, 9, 11, 12]. Следовательно, рецептор-опосредованный путь является универсальным типом эндоцитоза АФП для стволовых клеток.

Известно, что АФП переносится через мембрану посредством специфических АФП-СБ/рецепторов на поверхности клеток [8–11]. В изученных типах ГСК костного мозга АФП связывается с тремя АФП-СБ/рецепторами на поверхности их плазматической мембраны: р60 белок CD34⁺133⁺117⁻135⁻ ГСК, а также р305 и р65 белки CD34⁺133⁻117⁺135⁻ и CD34⁺133⁻117⁻135⁺ ГСК. Эти АФП-СБ принадлежат к гликопротеинам с низкой (р60), средней (р305) и высокой (р65) аффинностью [29], что, по всей видимости, объясняет различие в уровнях транспорта ¹²⁵I-меченного АФП в цитоплазму изученных типов ГСК. Однако подобное различие в аффинности АФП-СБ/рецепторов может

говорить о роли эндоцитозного пути АФП в регуляции биологических процессов ГСК: более значимое влияние на процессы CD34⁺133⁻117⁺135⁻ и CD34⁺133⁻117⁻135⁺ ГСК по сравнению с CD34⁺133⁺117⁻135⁻ ГСК. Следовательно, основную функциональную нагрузку эндоцитозный путь АФП несет в активированных ГСК и клетках – предшественниках гемопоэза, а не в покоящихся и не самообновляющихся субпопуляциях ГСК.

Анализ молекулярных составляющих эндоцитозного пути АФП показал, что во всех изученных типах ГСК костного мозга функционирует клатрин-зависимый механизм образования рецепторосомы, в формировании и образовании которой участвуют AP-2 белковый комплекс, динамин и эндофилин. Следовательно, эндоцитоз АФП в трех различных по степени зрелости типах ГСК костного мозга мышей имеет одинаковую молекулярную характеристику и реализуется посредством классического клатрин-опосредованного трансмембранного транспорта белков. Аналогичный способ транспорта АФП, а также ряда других белков альбуминоидного семейства, в частности наиболее близкого по структуре – АЛБ, реализуется в эмбриональных клетках, а также в клетках раз-

Таблица 7. АФП-индуцированное изменение биологической активности ГСК костного мозга в присутствии ингибиторов клатрина и Ерас1/2

Индукторы	Функциональная активность ГСК, %				
	ИП	ИБСА	ИМА	ИКА	ИИА
CD34 ⁺ 133 ⁻ 117 ⁻ 135 ⁺					
АФП	89,7 ± 5,8	80,4 ± 5,3	165,7 ± 10,4	179,0 ± 10,4	38,6 ± 2,4
ERKInh + АФП	19,8 ± 3,1*	20,3 ± 3,5*	55,6 ± 4,1*	54,3 ± 3,9*	8,4 ± 2,6*
Амантадина хлорид + ERKInh + АФП	17,3 ± 3,7*	10,1 ± 2,1**	41,2 ± 3,8**	50,2 ± 5,1**	6,6 ± 2,1*
CD34 ⁺ 133 ⁺ 117 ⁺ 135 ⁻					
АФП	48,7 ± 1,6	89,9 ± 2,6	92,9 ± 3,6	136,2 ± 10,7	24,5 ± 2,0
ERKInh + АФП	24,9 ± 3,0*	50,1 ± 6,0*	54,2 ± 5,9*	58,2 ± 5,0*	8,9 ± 1,1*
Амантадина хлорид + ERKInh + АФП	45,3 ± 4,2*	28,7 ± 3,3**	32,1 ± 4,2**	51,7 ± 5,8*	6,5 ± 1,8*

Примечание. АФП – альфа-фетопроtein; ИП – индекс пролиферации; ИБСА – индекс белок-синтетической активности; ИМА – индекс метаболической активности; ИКА – индекс клоногенной активности; ИИА – индекс иммуносупрессорной активности. * Достоверность результатов в сравнении с эффектом АФП в отсутствие ингибитора ERKInh P < 0,05. ** Достоверность результатов в сравнении с эффектом АФП в присутствии ингибитора ERKInh P < 0,05.

личных фетальных тканей, овальных клетках печени [1, 10–12]. Это позволяет предположить, что клатрин-зависимый механизм образования рецепторосомы является основным способом транспорта АФП в цитоплазму стволовых клеток.

Анализ внутриклеточного распределения АФП в цитоплазме изученных типов ГСК костного мозга мышей показал, что аналогично другим типам клеток различного происхождения и степени «зрелости» [1, 3, 9, 11] он определялся в комплексе Гольджи, цитоплазме, ЭПР и митохондриях. Однако выявление нефрагментированного АФП в CD34⁺133⁺117⁻135⁻ ГСК только в комплексе Гольджи свидетельствует лишь о транспортной роли поглощенного клеткой АФП. Это подтверждает тот факт, что белок р60, участвующий в трансмембранном транспорте АФП в данном типе ГСК, имеет низкую аффинность и перекрестное взаимодействие с АЛБ в больших его концентрациях [29, 33]. Следовательно, в покоящихся и не самообновляющихся субпопуляциях (менее «зрелых») ГСК эндоцитозный путь АФП не играет регуляторной роли в противоположность активированным ГСК и клеткам — предшественникам гемопоэза.

Анализ возможного механизма внутриклеточного распределения АФП показал, что в комплекс Гольджи изученных ГСК он попадает через слияние компонентов комплекса с образовавшейся рецепторосомой (эндосомой). Это согласуется с общим механизмом транспорта содержимого эндосом в комплекс Гольджи в ходе клатрин-зависимого механизма образования везикулы [32, 34]. Выход АФП в цитоплазму CD34⁺133⁺117⁺135⁻ и CD34⁺133⁺117⁻135⁺ ГСК вероятнее всего связан с растворением клатриновых оболочек. При этом АФП высвобождается из рецепторосомы в нативном состоянии, что предполагает его потенциальное участие в регуляции физиологических процессов ГСК [1, 3, 9, 11]. Транспорт АФП в ЭПР изученных ГСК не был связан с СОР-зависимым образованием вторичной эндосомы и транспортом в ЭПР. Следовательно, АФП транспортируется в ЭПР другим способом, не связанным с СОР-зависимым механизмом. Наиболее вероятно, что транспорт АФП в ЭПР, а также митохондрии CD34⁺133⁺117⁺135⁻ и CD34⁺133⁺117⁻135⁺ ГСК

осуществляется единственным возможным способом — через систему внутриклеточного распределения белков в органеллы [31]. В эту систему входят два основных компонента цитоплазмы: белок-распределитель — шаперон, осуществляющий транспорт к органеллам, и трансоргanelльный белок — транспортер, способствующий переходу через белки-порины мембраны органелл [31], причем последний должен фосфорилироваться или инициировать фосфорилирование порина, так как его функционирование зависит от энергии АТФ [31]. В цитоплазме CD34⁺133⁺117⁺135⁻ и CD34⁺133⁺117⁻135⁺ ГСК выявлены две пары схожих между собой по молекулярной массе, структурным и биохимическим свойствам АФП-СБ/рецепторов — р147 и р182, а также р55 и р52 [30], с которыми АФП взаимодействовал в цитозоле CD34⁺133⁺117⁺135⁻ и CD34⁺133⁺117⁻135⁺ ГСК после его выхода из рецепторосомы. Необходимо отметить, что АФП-СБ/рецепторы р55 и р52 по своей структуре и свойствам [30] схожи с шаперонами [35, 36], а фосфорилирующиеся *in vitro* и *in vivo* АФП-СБ/рецепторы р147 и р182 — с трансоргanelльными транспортерами [31]. Кроме того, упомянутые пары АФП-СБ подобны белкам других типов нормальных и опухолевых клеток, участвующих в транспорте АФП по внутриклеточному пространству, а также трансоргanelльном переносе в ЭПР и митохондрии [9, 11]. Все это указывает на то, что АФП-СБ/рецепторы р55 и р52, р147 и р182 составляют систему внутриклеточного распределения АФП в ЭПР и митохондрии CD34⁺133⁺117⁺135⁻ и CD34⁺133⁺117⁻135⁺ ГСК.

Рецептор-опосредованный эндоцитоз лигандов может оказывать влияние на биологические функции клетки тремя основными способами: 1) за счет индукции сигнальных каскадов рецептором в составе эндосомы; 2) за счет индукции сигнальных молекул составными компонентами эндоцитозного транспорта; 3) за счет индукции сигнальных и регуляторных молекул самим лигандом в случае его выхода в нативном виде в цитоплазму из эндосомы [31, 32, 37, 38]. Для рецептор-опосредованного эндоцитоза АФП возможны только два последних способа модуляции функциональной активности изучаемых субпопуляций ГСК, так как первый способ подразумевает, что взаимодействующий с

лигандом рецептор является рецепторной киназой [31, 37], напрямую фосфорилирующей каталитическим доменом сигнальные молекулы. Однако ни один из мембранных АФП-СБ изучаемых субпопуляций ГСК не фосфорилировался ни в условиях *in vitro*, ни в условиях *in vivo* [33]. В настоящем исследовании установлено, что рецептор-зависимый эндоцитоз АФП в CD34⁺133⁺117⁻135⁻ ГСК не участвует во внутриклеточной регуляции их функций, а необходим для доставки АФП-ассоциированных лигандов, аналогично другим типам недифференцированных клеток [1, 12, 13]. В CD34⁺133⁻117⁺135⁻ и CD34⁺133⁻117⁻135⁺ ГСК рецептор-опосредованный эндоцитоз является одним из механизмов регуляции биологической активности упомянутых типов ГСК в ходе их взаимодействия с АФП. Однако важно отметить, что такой механизм лишь отчасти ответствен за прямую регуляцию биологической активности этих типов ГСК, а именно за регуляцию белок-синтетической и метаболической активности, в то время как его влияние на пролиферативную клоногенную и иммуносупрессорную активность является опосредованным через ERK1/2-зависимый сигнальный каскад. Что касается способа регуляции белок-синтетической и метаболической активности, то он, возможно, реализуется за счет активации регуляторных молекул самим АФП в цитоплазме, ЭПР и митохондриях, в которые он попадает после выхода из эндосомы. Так, в составе аминокислотной последовательности АФП имеются участки, комплементарные некоторым факторам регуляции функции рибосом и митохондрий, а также транскрипционным факторам и их репрессорам [3, 16, 17].

Авторы выражают глубокую признательность д-ру биол. наук, проф. О.В. Есыреву за научные консультации при написании работы. Настоящая работа выполнена в рамках проекта «Исследование молекулярных механизмов активации натуральных супрессорных (NS) клеток и разработка на их основе клеточной диагностики рака» (ГР № 0106РК00186) Министерства образования и науки Республики Казахстан, а также проекта «Разработка новых противоифекционных препаратов на 2009–2011 гг.» Министерства индустрии и новых технологий Республики Казахстан.

A.Yu. Bogdanov, T.M. Bogdanova, A.I. Ilin

The Scientific Centre for Anti-infectious Drugs,
Almaty, 050060, Kazakhstan
E-mail: andrbogd@gmail.com

ENDOCYTIC PATHWAY OF ALPHA-FETOPROTEIN IN MICE BONE MARROW HEMATOPOIETIC STEM CELLS: MOLECULAR CHARACTERIZATION AND ROLE IN BIOLOGICAL ACTIVITY MODIFICATION

Endocytic pathway of alpha-fetoprotein (AFP) in three different, by the degree of maturity, types of the mouse bone marrow hematopoietic stem cells (HSC) is similar in its nature: it was based on the receptor-mediated transport through the membrane p60, p65 and p305 AFP receptors with clathrin-dependent mechanism of receptorosome organization, in the formation and generation of which AP-2 complex, endophilin, and dynamin are involved. In the studied types of HSCs, the non-degraded AFP was detected in Golgi complex through the formed receptorosome merging with it, as well as in the cytoplasm, endoplasmic reticulum, and mitochondria, presumably through sequential binding to the cytoplasmic distributor proteins – p55, p52, p62 and p67 AFP receptors, and also to transorganelle transporter proteins – p147 and p182 AFP receptors. The investigation of the role of AFP endocytosis in changing the biological activity of the studied types of HSCs has shown that it directly regulated the protein synthesis and metabolic activity, while its effect on other examined types of biological activity was mediated by ERK1/2.

А.Ю. Богданов, Т.М. Богданова, О.І. Ільїн

ЭНДОЦИТОЗНИЙ ШЛЯХ АЛЬФА-ФЕТОПРОТЕЇНУ В ГЕМОПОЕТИЧНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИНАХ КІСТКОВОГО МОЗКУ МИШЕЙ: МОЛЕКУЛЯРНА ХАРАКТЕРИСТИКА ТА РОЛЬ У ЗМІНІ БІОЛОГІЧНОЇ АКТИВНОСТІ

Ендоцитозний шлях альфа-фетопротеїну (АФП) в трьох різних за ступенем зрілості типах гемопоетичних стовбурових клітин (ГСК) кісткового мозку мишей є схожим за своєю природою: в його основі лежить рецептор-опосередкований транспорт через мембранні p60, p65 і p305 рецептори АФП, з клатрін-залежним механізмом утворення рецепторосоми, у формуванні якої беруть участь комплекс AP-2, ендофілін та динамін. В досліджених типах ГСК недеградований АФП виявлявся в комплексі Гольджі, проникаючи туди через злиття утвореної з ним рецепторосоми, а також у цитоплазмі, ендоплазматичному ретикулумі та мітохондріях, можливо, за допомогою послідовного зв'язування з цитоплазма-

тичними білками-розподільниками – p55, p52, p62 і p67 рецепторами АФП, а також трансорганельними білками-транспортерами – p147 та p182 рецепторами АФП. Дослідження ролі ендоцитозу АФП в зміні біологічної активності вивчених типів ГСК показало, що він безпосередньо регулював білоксинтетичну та метаболічну активність, а його вплив на інші досліджені види біологічної активності був опосередкований через ERK1/2.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Mizejewski G.J.* Biological roles of alpha-fetoprotein during pregnancy and perinatal development // *Exp. Biol. Med.* – 2004. – **229**. – P. 439–463.
2. *Yin Z.F., Wang C.H.* Research advances on alpha-fetoprotein physiological function and clinical potential // *Ai Zheng.* – 2003. – **22**. – P. 108–121.
3. *Mizejewski G.J.* Alpha-fetoprotein as a biologic response modifier : Relevance to domain and subdomain structure // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* – 1997. – **215**. – P. 333–362.
4. *Trojan J., Uriel J.* Immunocytochemical localization of alpha-fetoprotein (AFP) and serum albumin (ALB) in ecto-, meso- and endodermal tissue derivatives of the developing rat // *Oncodev. Biol. Med.* – 1982. – **3**. – P. 13–22.
5. *Богданов А.Ю., Суворова М.А., Кудрина Н.О. и др.* Исследование эндоцитоза альфа-фетопротеина в гемопоэтических стволовых клетках костного мозга in vitro // *Гигиена, эпидемиология и иммунобиология.* – 2010. – № 3. – С. 130–135.
6. *Torres J.M., Geuskens M., Uriel J.* Activated human T lymphocytes express albumin binding proteins which cross-react with alpha-fetoprotein // *Eur. J. Cell. Biol.* – 1992. – **57**. – P. 222–228.
7. *Geuskens M., Torres J.M., Esteban C., Uriel J.* Morphological characterization of the pathway of endocytosis and intracellular processing of transferrin and alpha-fetoprotein in human T lymphocytes stimulated with phytohemagglutinin (PHA) // *Eur. J. Cell. Biol.* – 1989. – **50**. – P. 418–427.
8. *Laderoute M.P.* The characterization of a novel, widespread PNA-reactive tumor associated antigen : The alpha-fetoprotein receptor/binding protein : PhD Thesis. – Alberta, 1991. – 208 p.
9. *Mizejewski G.J.* Alpha-fetoprotein binding proteins: implications for transmembrane passage and sub-cellular localization // *Life Sci.* – 1995. – **56**. – P. 1–9.
10. *Mizejewski G.J.* Review of the putative cell-surface receptors for alpha-fetoprotein: identification of a candidate receptor protein family // *Tumor Biol.* – 2011. – **32**. – P. 241–258.
11. *Mizejewski G.J.* Alpha-fetoprotein signal sequences: a proposed mechanism for subcellular localization and organelle targeting // *J. Theor. Biol.* – 1995. – **176**. – P. 103–113.
12. *Laborda J., Naval J., Calvo M. et al.* Alpha-fetoprotein and albumin uptake by mouse tissues during development // *J. Biol. Neonate.* – 1991. – **56**. – P. 332–341.
13. *Aussel C., Laliberti F., Masseyeff R.* Alpha-fetoprotein favours accumulation of estrone but not arachidonic acid into the fetal and new-born rat brain // *Life Sci.* – 1985. – **36**. – P. 479–484.
14. *Mizejewski G.J., Keenan J.F., Setty R.P.* Separation of the estrogen-activated growth regulatory forms of alpha-fetoprotein in mouse amniotic fluid // *Biol. Red.* – 1990. – **42**. – P. 887–898.
15. *Jacobson H.I., Marotta D., Mizijewski G.J. et al.* Estradiol-induced changes in spectral and biologic properties of alpha-fetoprotein // *Proc. Int. Soc. Oncodev. Biol. Med.* – 1989. – **11**. – P. 17–27.
16. *Mizejewski G.J.* An apparent dimerization motif in the third domain of alpha-fetoprotein: molecular mimicry of the steroid/thyroid nuclear receptor superfamily // *BioEssays.* – 1993. – **15**. – P. 427–432.
17. *Dauphinee M.J., Mizejewski G.J.* Human alpha-fetoprotein contains potential heterodimerization motifs capable of interaction with nuclear receptors and transcription/growth factors // *Med. Hypotheses.* – 2002. – **58**. – P. 453–461.
18. *Богданов А.Ю.* Молекулярные механизмы активации естественных супрессорных клеток альфа-фетопротеином : Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Алматы, 2005. – 23 с.
19. *Богданова Т.М., Дубешко С.Я., Фомычова Е.В. et al.* Alpha-fetoprotein effects on growth activity of mice bone marrow hematopoietic stem cells ex vivo // *Med. vestnik Erebuni.* – 2010. – № 4. – P. 131–146.
20. *Богданова Т.М., Дубешко С.Я., Фомычова Е.В. et al.* Alpha-fetoprotein effects on functional and morphological profile of the mice bone marrow hematopoietic stem cells ex vivo // *Med. vestnik Erebuni.* – 2010. – № 4. – P. 147–165.
21. *Богданова Т.М., Богданов А.Ю., Беляев Н.Н.* Анализ вторичных мессенджеров в функциональной активности гемопоэтических стволовых клеток при их индукции альфа-фетопротеином // *Биотехнология. Теория и практика.* – 2008. – № 1. – С. 70–81.
22. *Богданов А.Ю., Богданова Т.М., Айтхожина Н.А.* Роль цАМФ- и ERK1/2-зависимых каскадов в альфа-фетопротеин-индуцированном изменении функциональной активности гемопоэтических стволовых клеток костного мозга в условиях in vitro // *Изв. НАН Республики Казахстан. Сер. биол.* – 2010. – № 3. – С. 30–36.

23. Богданов А.Ю., Саввулиди Ф.Г., Тлеулиева Р.Т., Беляев Н.Н. Альфа-фетопроtein как индуктор натуральных супрессорных (NS) клеток костного мозга. 1. Изопикнические фракции NS-клеток и их супрессорные эффекты // Биотехнология. Теория и практика. – 2004. – № 3. – С. 83–89.
24. Sugiura K., Ikehara S., Inaba M. Enrichment of murine bone marrow natural suppressor activity in the fraction of hematopoietic progenitors with interleukin-3 receptor-associated antigen // Exp. Hematol. – 1992. – 20. – P. 256–263.
25. Закирьянова Г.К., Беляев Н.Н. Изопикническое разделение клеток костного мозга // Методы молекулярной биологии, биохимии, иммунохимии, биотехнологии. – Алматы : Гридан, 1999. – С. 142–145.
26. Rosenberg I.M. Protein analysis and purification. – Boston : Birkhäuser, 1996. – 434 p.
27. Freshney R.I. Culture of Animal Cells. – New York : Wiley-Liss Inc., 2000. – 438 p.
28. Segerson E.C., Beetham P.K. Suppressor activity of bone marrow cells and localization of fluorescent-labeled bone marrow cells within ovine and endometrial tissue // J. Anim. Sci. – 2000. – 78. – P. 709–717.
29. Rybakova T.M., Nizkorodova A.S., Zhigailov A.V. et al. Membrane alpha-fetoprotein binding proteins of hematopoietic stem cells: structural, physical-chemical and biochemical properties // VII Eur. Symp. of Protein Societ (May 12–16, 2007, Sweden): Abstracts-book. – Stockholm : Uppsala Univ., 2007. – P. 214.
30. Rybakova T.M., Nizkorodova A.S., Zhigailov A.V. et al. Cytosol alpha-fetoprotein binding proteins of hematopoietic stem cells: structural, physical-chemical, biochemical and functional properties // Ibid. – P. 149.
31. Alberts B., Johnson A., Lewis J. et al. Molecular Biology of the Cell. – New York : Garland Pubg., 2004. – P. 615–657.
32. Marsh M. Endocytosis. – London : Oxford Univ. press, 2001. – 216 p.
33. Rybakova T.M., Nizkorodova A.S., Zhigailov A.V. et al. Functional properties and attribute of hematopoietic stem cells membrane alpha-fetoprotein binding proteins // Eur. Symp. of Protein Societ (May 12–16, 2007, Stockholm, Swede) : Abstracts-book. – Stockholm : Uppsala Univ., 2007. – P. 92.
34. Rappoport J.Z. Focusing on clathrin-mediated endocytosis // Biochem. J. – 2008. – 412. – P. 415–423.
35. Ellis R.J. Molecular chaperones: assisting assembly in addition to folding // Trends Biochem. Sci. – 2006. – 31. – P. 395–401.
36. Ellis R.J. Protein misassembly: macromolecular crowding and molecular chaperones // Adv. Exp. Med. Biol. – 2007. – 594. – P. 1–13.
37. McPherson P.S., Kay B.K., Hussain N.K. Signaling on the endocytic pathway // Traffic. – 2004. – 2. – P. 375–384.
38. Di Fiore P.P., Gill G.N. Endocytosis and mitogenic signaling // Curr. Opin. Cell. Biol. – 1999. – 11. – P. 483–488.

Поступила 19.04.12