

Регуляція активності фосфатидилінозит-3-кінази в процесі мегакаріоцитної диференціації клітин еритролейкемії людини лінії K562, індукованої форбол-12-міристат-13-ацетатом

О. М. Ільницька, Г. О. Олексин, С. Й. Кусень, Л. Б. Дробот

Інститут біології клітини НАН України
Вул. Драгоманова, 14/16, Львів, 79005, Україна

E. mail: olga@biochem.lviv.ua

Вивчали вплив форбол-12-міристат-13-ацетату (РМА) на рівень експресії р85 α регуляторної субодиниці фосфатидилінозит (PI)-3-кінази та зміни PI-3-кіназної активності в процесі мегакаріоцитної диференціації клітин K562. Показано, що рівень експресії р85 α залишається незмінним протягом 72 год культивування як у контрольних, так і в РМА-індукованих клітинах. У той же час координовані зміни PI-3-кіназної активності в клітинах, що диференціюються, у порівнянні з контролем свідчать про диференційну роль PI-3-кіназного сигнального шляху в регуляції проліферації і РМА-залежної мегакаріоцитної диференціації клітин K562.

Скорочення. РМА — форбол-12-міристат-13-ацетат; PI-3-кіназа — фосфатидилінозит-3-кіназа; PI — фосфатидилінозит; ПВДФ мембрана — полівінілідифторидна мембрана; ПААГ — поліакриламідний гель; ТШХ — тонкошарова хроматографія.

Вступ. Низькодиференційована лінія клітин еритролейкемії людини K562 з високим рівнем експресії онкобілка p210 Bcr-Abl, якому притаманна конститутивна тирозинкіназна активність, зберігає здатність до диференціації під дією агентів різної хімічної природи та скерованості дії [1, 2]. Зокрема, зміни експресії ряду специфічних генів, індуковані пухлинним промотором форбол-12-міристат-13-ацетатом (РМА), ведуть до диференціації клітин лінії K562 в мегакаріобласти — попередники тромбоцитів [1, 2]. Обробка клітин лінії K562 РМА призводить до зупинки росту, морфологічних змін, підвищення адгезії клітин [3]. Ефекти РМА можуть опосередковуватися як прямою активацією Ca²⁺-фосфоліпід-залежної протеїнкінази С (ПКС-залежні ефекти), так і впливом на інші сигнальні шляхи (ПКС-незалежні ефекти) [2—4]. Так, РМА-індукована активація ядерних факторів транскрипції AP-1 і NF- κ B опосередковується акти-

вацією Ras-Raf-1/МАР кіназного каскаду [3, 5]. Роль PI-3-кіназного сигнального шляху в РМА-індукованій диференціації клітин K562 ще не з'ясована.

Враховуючи дані стосовно того, що PI-3-кіназа є медіатором онкогенної дії Bcr-Abl, у даній роботі проаналізовано вплив РМА на рівень експресії р85 α регуляторної субодиниці PI-3-кінази та зміни PI-3-кіназної активності в процесі мегакаріоцитної диференціації клітин K562.

Матеріали і методи. *Культивування клітин.* В експериментах використовували клітини еритролейкемії людини лінії K562, отримані з колекції клітинних культур Інституту цитології РАН. Клітини культивували, як описано в роботі [6]. Мегакаріоцитну диференціацію клітин K562, що знаходилися в логарифмічній фазі росту, індукували РМА («Sigma», США) в концентрації 160 нМ. Мегакаріоцитну диференціацію оцінювали цитоморфологічними методами. Клітинні лізати отримували, як описано раніше [6]. Концентрацію

білка в супернатантах визначали за методом Петерсона [7].

Дослідження експресії p85 α . Експресію p85 α досліджували методом імуноблотингу. Для імунопреципітації p85 α загальні лізати клітин K562 інкубували з моноклональними анти-p85 α антитілами протягом 2 год при температурі 4 °С (моноклональні антитіла люб'язно надані д-ром І. Гутом, Інститут ракових досліджень Людвіга (Велика Британія)). Утворені імунні комплекси осаджували за допомогою білок G-сефарози («Pharmacia», Швеція) протягом 1 год. Гранули сефарози промивали 4 рази буфером лізису і прогрівали в буфері для зразків Леммлі протягом 5 хв при 100 °С. Отримані імунопреципітати розділяли електрофорезом у градієнті концентрації ПААГ (5—17 %) у присутності SDS [8] з наступним електропереносом на ПВДФ мембрану («Whatman», Велика Британія) [9]. Вільні центри зв'язування на мембрані блокували 5 %-м сухим знежиреним молоком в ЗФР/0,1 % Tween-20. Детекцію p85 α на блятах здійснювали, використовуючи моноклональні антитіла до p85 α . Як другі антитіла використовували анти-мишачі IgG, мічені пероксидазою хрону («Sigma»). Імунореактивні зони виявляли за допомогою реагенту для посиленої хемілюмінесценції (ECL) («Amersham», Велика Британія). Кількісний аналіз імуноблотів здійснювали за допомогою програми «Image Tool».

Визначення PI-3-кіназної активності. Активність PI-3-кінази визначали в імунопреципітатах з лізатів клітин K562, які отримували, як описано вище. До відмитих імунних комплексів додавали 25 мкл 2 × PI-3-кіназного буферу (20 мМ трис-НСІ, рН 7,5; 100 мМ NaCl, 0,5 мМ EGTA), 10 мкл озвученого екзогенного субстрату L-альфа-фосфатидилінозиту з печінки бика («Sigma») (1 мг/мл у 5 мМ Нерес, рН 7,5) та 15 мкл реакційної суміші, що містила 138 мкМ АТР, 11,6 мМ MgCl₂ та 3—5 мкКі на пробу [γ -³²P]АТР («NEN», Бельгія). Реакцію зупиняли додаванням 100 мкл 1 М НСІ та 200 мкл суміші хлороформ:метанол (1:1). Екстраговані фосфоліпіди розділяли хроматографією на пластинках з тонким шаром силікагелю («Merck», ФРН) у системі розчинників 65 % 1-пропанол, 0,7 М СН₃СООН, 50 мМ Н₃РО₄. Мічені [³²P]-фосфоліпіди виявляли авторадіографією хроматограм. Радіоактивність прораховували на сцинтиляційному лічильнику.

Результати і обговорення. На сьогоднішній день отримано численні дані на користь того, що PI-3-кіназна активність не лише регулюється за участю химерної тирозинкінази p210 Bcr-Abl у клітинах хронічної мієлоїдної лейкемії, але й ві-

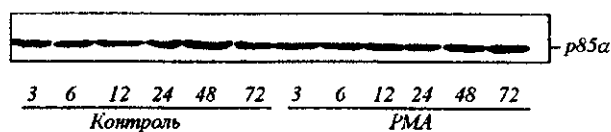


Рис. 1. Експресія регуляторної p85 α субодиниці PI-3-кінази в контрольних та PMA-індукованих клітинах K562. Імунопреципітацію p85 α здійснювали, використовуючи моноклональні анти-p85 α антитіла. Імунопреципітати розділяли електрофорезом у ПААГ в присутності SDS з наступним електропереносом на ПВДФ мембрану. p85 α виявляли за допомогою анти-p85 α моноклональних антитіл. Як другі антитіла використовували антимишачі IgG, мічені пероксидазою хрону

діграє провідну роль у підтриманні їхнього високого проліферативного статусу [10, 11]. У більшості випадків при індукції диференціації Ph⁺-позитивних клітин у культурі спостерігається down-регуляція як Bcr-Abl, так і ряду сигнальних білків, що беруть участь в реалізації ефектів згаданого онкобілка [12, 13]. У зв'язку з цим при вивченні можливої ролі PI-3-кіназного сигнального шляху в PMA-залежній мегакаріоцитній диференціації клітин K562 ми дослідили насамперед, чи змінюється рівень експресії регуляторної p85 α субодиниці ферменту протягом 72 год інкубації в присутності індуктора. Імунопреципітацію p85 α здійснювали, використовуючи моноклональні анти-p85 α антитіла з наступним імуноблотингом. Як видно з рис. 1, рівень експресії p85 α залишається незмінним протягом досліджуваного періоду часу як у контрольних, так і в PMA-індукованих клітинах.

На наступному етапі роботи ми проаналізували динаміку PI-3-кіназної активності в процесі PMA-індукованої мегакаріоцитної диференціації клітин K562. PI-3-кіназну активність визначали в імунопреципітатах лізатів клітин, використовуючи як субстрат PI. Отримані дані показали, що, незважаючи на експресію в клітинах K562 deregulованої тирозинної протеїнкінази p210 Bcr-Abl, PI-3-кіназна активність у контрольних клітинах не підтримується на постійному конститутивному рівні, а залежить від фази росту клітинної культури з максимумами на 6-ту і 48-му год і мінімумами на 12-ту і 72-гу год культивування (рис. 2, а). Звертає на себе увагу також залежність рівня PI-3-кіназної активності в клітинах, що диференціюються, від відповідних показників у контролі (підвищення активності у випадку нижчого рівня в контролі (12-та, 72-га год) і навпаки (3-тя, 48-ма год)) (рис. 2, а, б). Підвищення PI-3-кіназної активності на 46 % у порівнянні з контролем на 72-у год (рис. 2, в), коли спостерігається практично повна зупинка ро-

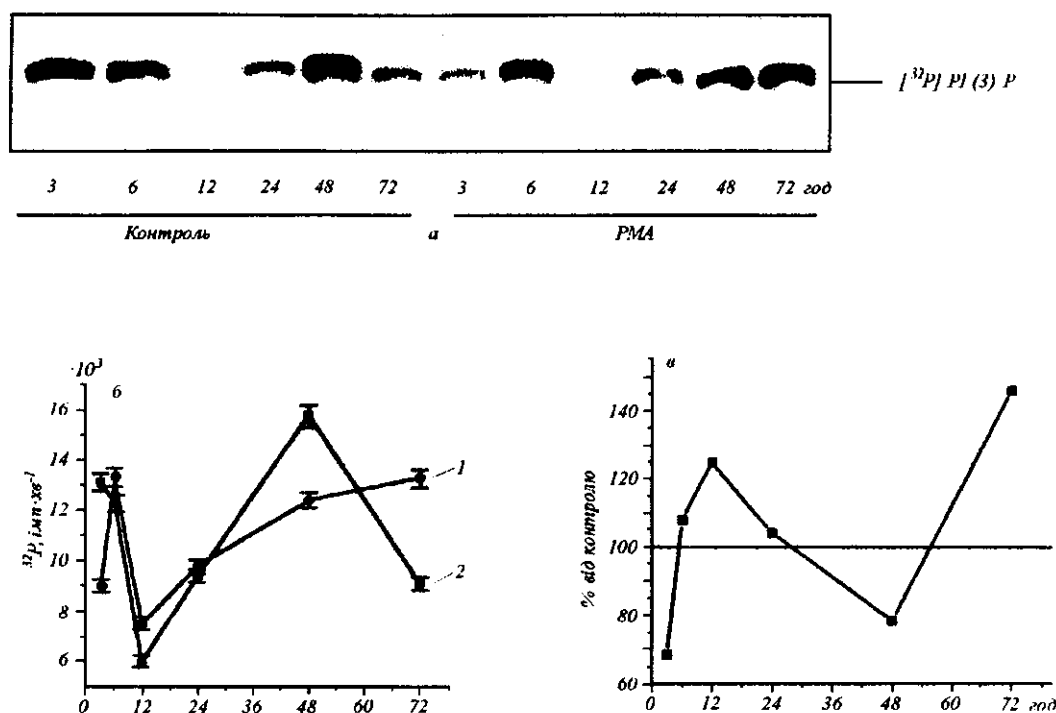


Рис. 2. PI-3-кіназна активність клітин K562 у процесі мегакаріоцитної диференціації, індукованої РМА (PI-3-кіназну активність визначали в анти-p85 α імунопреципітатах, використовуючи як субстрат PI; інозитвмісні ліпіди розділяли тонкошаровою хроматографією з наступною авторадіографією): а — авторадіограма продуктів PI-3-кіназної реакції, розділених хроматографією в тонкому шарі силікагелю; б — PI-3-кіназна активність ³²P в імп·хв⁻¹, включеного в PI (1 — РМА; 2 — контроль) (на рисунку представлено середні дані трьох незалежних експериментів); в — зміни PI-3-кіназної активності

сту клітин, свідчить про диференційну роль PI-3-кінази в регуляції як проліферації, так і РМА-залежної мегакаріоцитної диференціації клітин K562. Подальші дослідження будуть присвячені з'ясуванню молекулярних механізмів, залучених до регуляції активності PI-3-кінази в клітинах K562 при дії РМА.

Роботу частково профінансовано Міністерством науки і технології України (грант 5.4/38) та Західно-Українським Біомедичним дослідницьким центром (грант надано в 1999 р.).

O. M. Ilynska, H. O. Oleksyn, S. J. Kusen', L. B. Drobot

Regulation of phosphatidylinositol 3-kinase activity during the megakaryocytic differentiation in human erythroleukemia cell line K562 induced by phorbol 12-myristate 13-acetate

Summary

An influence of phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) on the expression of p85 α regulatory subunit of phosphatidylinositol (PI)

3-kinase, and on the PI 3-kinase activity during the megakaryocytic differentiation of K562 cells has been studied. It has been shown that the level of p85 α expression does not change during 72 h culturing in both control and PMA-induced cells. At the same time, the coordinated changes of PI 3-kinase activity in differentiated cells in comparison with control ones suggest a differential role of PI 3-kinase signalling pathway in the proliferation regulation and in PMA-dependent megakaryocytic differentiation of K562 cells.

O. M. Ильницкая, Г. О. Олексин, С. И. Кусень, Л. Б. Дробот

Регуляция активности фосфатидилинозит-3-киназы в процессе мегакариоцитной дифференцировки клеток эритролейкемии человека линии K562, индуцированной фобол-12-миристан-13-ацетатом

Резюме

Изучали влияние фобол-12-миристан-13-ацетата (РМА) на уровень экспрессии p85 α регуляторной субъединицы фосфатидилинозит (PI)-3-киназы и изменения PI-3-киназной активности в процессе мегакариоцитной дифференцировки клеток K562. Показано, что уровень экспрессии p85 α остается неизменным в течение 72 ч культивирования как в контрольных,

так и PMA-індуцированных клетках. В то же время координированные изменения PI-3-киназной активности в дифференцирующихся клетках по сравнению с контролем свидетельствуют о дифференциальной роли PI-3-киназного сигнального пути в регуляции пролиферации и PMA-зависимой мегакариоцитарной дифференцировки клеток K562.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Brevier G. Regulation of c-myc mRNA decay *in vitro* by a phorbol ester-inducible, ribosome-associated component in differentiating megakaryoblasts // *J. Biol. Chem.*—2000.—275, N 43.—P. 33336—33345.
2. Forsbeck K., Nilsson K., Hansson A., Skoglund G., Ingelman-Sundberg M. Phorbol ester-induced alteration of differentiation and proliferation in human hematopoietic tumor cell lines: relationship to the presence and subcellular distribution of protein kinase C // *Cancer Res.*—1985.—45.—P. 6194—6199.
3. Herera R., Hubbell S., Decker S., Petruzzelli L. A role for the MEK/MAPK pathway in PMA-induced cell cycle arrest: modulation of megakaryocytic differentiation of K562 cells // *Exp. Cell. Res.*—1998.—238, N 2.—P. 407—414.
4. Liu Y., Liu Y.-C., Meller N., Giampa L., Elly C., Doye M., Altman A. Protein kinase C activation inhibits tyrosine phosphorylation of Cbl and its recruitment of Src homology 2 domain-containing proteins // *J. Immunol.*—1999.—162, N 12.—P. 7095—7101.
5. Huang C., Schmold P. C., Ma W.-Y., Schmid H. H. O., Dong Z. Phosphatidylinositol-3 kinase is necessary for 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced cell transformation and activated protein 1 activation // *J. Biol. Chem.*—1997.—272, N 7.—P. 4187—4194.
6. Ільницька О. М., Мазур І. Я., Ігуменцева Н. І., Дробот Л. Б. Вивчення регуляції фосфатидилінозит 3-кіназного сигнального шляху в процесі гербіміцин А-індукованої еритроїдної диференціації клітин еритролейкемії людини лінії K562 // *Укр. біохім. журн.*—2001.—73, № 2.—С. 106—109.
7. Peterson G. L. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable // *Anal. Biochem.*—1977.—83, N 2.—P. 346—356.
8. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage // *Nature.*—1970.—227, N 259.—P. 680—685.
9. Towbin H., Staehelin T., Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1979.—76.—P. 4350—4354.
10. Harrison-Findik D., Misra S., Jain S. K., Keeler M. L., Powell K. A., Malladi C. S., Varticovski L., Robinson P. J. Dynamin inhibits phosphatidylinositol 3-kinase in hematopoietic cells // *Biochim. et biophys. acta.*—2001.—1538, N 1.—P. 10—19.
11. Skorski T., Kanakaraj P., Nieborowska-Skorska M., Ratajczak M. Z., Wen S. C., Zon G., Gewirtz A. M., Perussia B., Calabretta B. Phosphatidylinositol-3 kinase activity is regulated by BCR/ABL and is required for the growth of Philadelphia chromosome-positive cells // *Blood.*—1995.—86, N 2.—P. 726—736.
12. Campbell M. L., Lu D., Guo J. Q., Arlinghaus R. B. Inhibition of phosphorylation of p210 BCR-ABL complets during early stages of phorbol ester-induced differentiation of K562 cells // *Cell Growth Differ.*—1993.—4, N 7.—P. 581—588.
13. Li W. J., Smith L. A., Kabat K. G., Kloetzer W. S., Arlinghaus R. B. Differential effects of tumor promoters on P210 bcr-abl expression // *Hematol. Pathol.*—1989.—3, N 3.—P. 113—123.

УДК 577.151.4

Надійшла до редакції 08.10.01