

УДК 591.169:591.3

ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗМОЖНОГО УЧАСТИЯ МЕК МИТОГЕН-АКТИВИРУЕМОЙ ПРОТЕИНКИНАЗЫ И TGF- β РЕЦЕПТОРА В ПРОЦЕССАХ РЕГЕНЕРАЦИИ ПЛАНАРИЙ С ПОМОЩЬЮ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОГО ИНГИБИТОРНОГО АНАЛИЗА

© 2014 г. А. М. Ермаков, О. Н. Ермакова, С. А. Ермолаева

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН

142290 Пущино, Московская обл., ул. Институтская, д. 3

E-mail: ao_ermakovy@rambler.ru

Поступила в редакцию 16.11.13 г.

Окончательный вариант получен 14.03.14 г.

В работе с помощью фармакологического ингибиторного анализа у пресноводных плоских червей планарий *Schmidtea mediterranea* исследовано возможное участие МЕК митоген-активируемой протеинкиназы и TGF- β рецептора в процессах регенерации и морфогенеза. Показано, что фармакологические ингибиторы данных протеинкиназ приводят к значительному подавлению регенерации головной части животных. При этом данный эффект реализуется за счет ингибирования пролиферативной активности стволовых клеток планарий — необластов. Продемонстрировано, что подавление исследуемых протеинкиназ у регенерирующих планарий приводит к значительным нарушениям процессов дифференцировки стволовых клеток и морфогенеза.

Ключевые слова: планарии, регенерация, МЕК и TGF- β протеинкиназы, фармакологические ингибиторы, стволовые клетки, пролиферация, дифференцировка.

DOI: 10.7868/S0475145014050048

Пресноводные плоские черви планарии — уникальный биологический объект для исследований в области биологии стволовых клеток, регенерации и морфогенеза (Gentile et al., 2011). Все биологические свойства планарий зависят от плюрипотентных соматических стволовых клеток — необластов (Baguna, 1981; Newmark, Sanchez Alvarado, 2000). Эта популяция клеток имеет определенную морфологию и экспрессирует свойственные ей гены “стволовости”, которые во многом схожи с таковыми у млекопитающих (Onal et al., 2012; Labbé et al., 2012). В последнее десятилетие у планарий проводятся исследования молекулярно-генетических механизмов регуляции процессов регенерации (Shibata et al., 2010).

Митоген-активируемые протеинкиназы (МАРК) — эволюционно консервативная внутриклеточная каскадная сигнальная система, которая регулирует множество функций, в том числе пролиферацию и дифференцировку клеток (Yang et al., 2013). Семейство МАРК протеинкиназ включает три подсемейства — это белки p38, JNK/SAPK (c-Jun N-terminal kinase/Stress activated protein kinase) и ERK (Extracellular signal-regulated kinase) (Потехина, Надеждина, 2002). Показано, что во всех случаях активация протеинкиназ

семейства ERK связана с клеточным выживанием и стимуляцией пролиферации, а активация протеинкиназ семейств p38 с индукцией апоптоза (Kyriakis, Avruch, 2012).

С МАРК, а именно звеном белков группы p38, связаны сигнальные каскады трансформирующего ростового фактора (TGF) и его рецептора, которые контролируют клеточную пролиферацию, дифференцировку и апоптоз, а также множество других функций (Heldin et al., 2009). У планарий ERK и сигнальные системы, связанные с TGF на сегодняшний день исследованы слабо, поэтому цель данной работы — исследование возможного участия МЕК митоген-активируемой протеинкиназы и TGF- β рецептора в процессах регенерации планарий *Schmidtea mediterranea* с помощью фармакологического ингибиторного анализа.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные

Работа выполнена на планариях *Schmidtea mediterranea* (Platyhelminthes, Triclada), бесполой лабораторной расе плоских червей. Планарий содержали в прудовой воде (смесь отстоянной водопроводной и дистиллированной в пропорции 3/2)

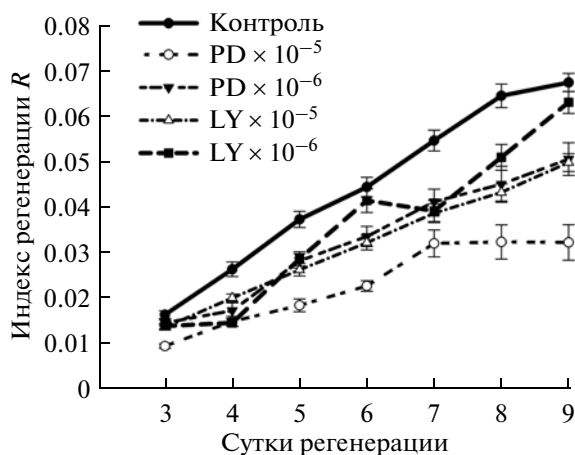


Рис. 1. Динамика регенерации головной части планарий *S. mediterranea* в присутствии ингибиторов митоген-активируемой протеинкиназы MEK – PD 98059 и протеинкиназы – рецептора TGF-β – LY 364947.

при комнатной температуре и кормили раз в неделю личинками двукрылых. Для экспериментов по исследованию динамики регенерации отбирали животных длиной около 8 мм или 3–4 мм (для оценки митотической активности необластов) и прекращали их кормление за 7 дней до опытов. Регенерация вызывалась ампутацией 1/5 части тела планарий, содержащей головной ганглий, в области непосредственно за глазами.

Температура воды в экспериментальном и контрольном сосудах поддерживалась одинаковой, на уровне $21 \pm 0.5^\circ\text{C}$. Эксперименты в каждой серии повторялись не менее 3-х раз на группах, включающих в среднем по 30 животных.

Метод прижизненной компьютерной морфометрии

Для оценки динамики роста регенерационной почки (бластемы) использовали метод прижизненной морфометрии планарий (Тирас, Сахарова, 1984). В качестве количественного критерия роста использовали индекс регенерации $R = s/S$, где s – площадь бластемы, S – площадь всего тела регенеранта. Каждое из измеряемых значений R – результат усреднения измерений по 30 животным. Изменение индекса регенерации оценивали по методу, описанному в работе Ермаковой и сотр. (Ермакова и др., 2009).

Метод иммуногистохимического окрашивания и подсчета количества митотических клеток в теле планарий

Планарий обездвигивали в течение 5 мин в 7% растворе N-ацетил цистеина и фиксировали в 4% растворе формальдегида в ФСБ + 0.3% Triton X100 в течение 20 мин. Дальнейшие процедуры проводили согласно протоколу, описанному в ра-

боте Ньюмарка и Альварадо (Newmark, Sanchez Alvarado, 2000). Для выявления митотических клеток в теле планарий использовали первичные антитела на фосфорилированный гистон 3 (Santa Cruz, США) в разведении 1/700 и вторичные антитела с флуоресцентным красителем CF488A (Biotium, США) в разведении 1/1000. Планарий после отмывки от вторичных антител помещали в среду для иммуофлуоресценции Vectashield (Vector Labs, США) и микроскопировали с помощью конфокального микроскопа Leica Microsystems SP5 (Германия). Полученные изображения планарий обрабатывали программой ImageJ (NIH, США), с помощью которой производилось 3D моделирование морфологической и анатомической структуры тела планарии. Подсчет митотических клеток и площади животных осуществляли с помощью программы Axio Image (Carl Zeiss, Германия), далее определяли число митотических клеток на мм^2 площади тела животного и усредняли данное значение по измерениям у 10 животных. Изменение митотической активности необластов оценивали по методу, описанному в работе Ермаковой и др. (Ермакова и др., 2009).

Статистическая обработка полученных результатов

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы “Sigma-Plot 9.11” (Systat Software Inc., Германия). Для анализа данных использовали дисперсионный однофакторный анализ ANOVA.

Обработка планарий ингибиторами митоген-активируемых протеинкиназ

В работе использовались ингибиторы митоген-активируемой протеинкиназы MEK – PD 98059 (Santa Cruz, США) и протеинкиназы – рецептора TGF-β – LY 364947 (Santa Cruz, США). Стоковые растворы готовили путем растворения в ДМСО навески препарата до концентрации 10^{-2} М. Далее стоковый раствор добавляли непосредственно в воду с декапитированными планариями до конечных концентраций 10^{-5} или 10^{-6} М, которые на стадии предварительных экспериментов были определены как не токсичные. Вода с контрольными группами животных содержала ДМСО в тех же концентрациях, что и раствор с подопытными группами.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рисунке 1 представлена динамика изменения индекса регенерации у планарий с 3 по 9 день после декапитации у контрольных групп планарий и подопытных, после воздействия ингибиторов PD 98059 и LY 364947. Данные препараты до-

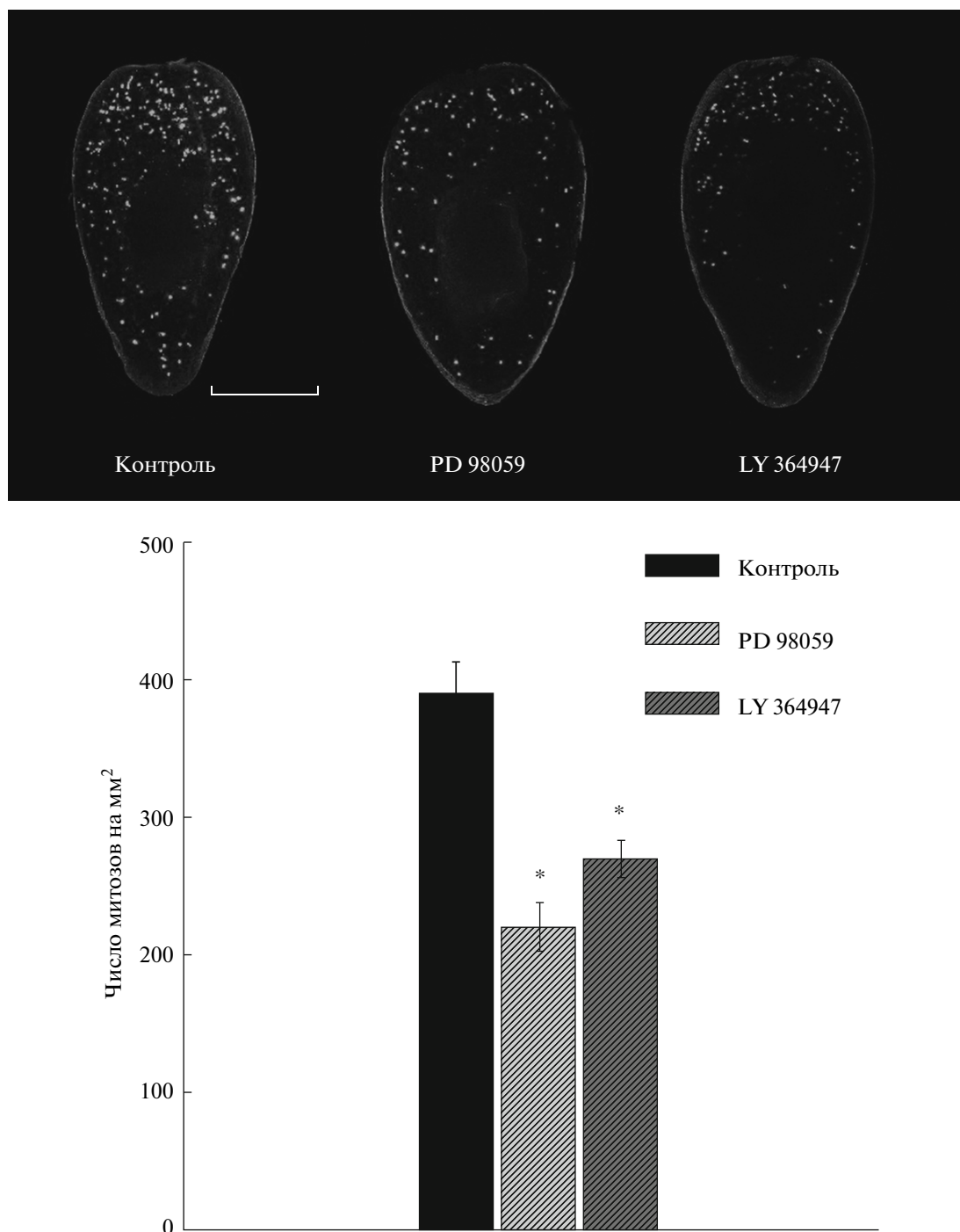


Рис. 2. Ингибирование митотической активности необластов в теле планарий после воздействия ингибиторов PD 98059 и LY 364947. Цена деления на микрофотографиях – 1 мм, * $p < 0.001$.

стительно подавляли рост головного конца тела животных. Максимальные эффекты ингибирования наблюдались при концентрациях 10^{-5} М. Так, эффект подавления роста головной бластемы препаратом PD 98059 на 3 сутки регенерации составлял $-94 \pm 8\%$ ($p < 0.001$), далее он постепенно уменьшался до $-52 \pm 9\%$ ($p < 0.001$) к 9 суткам.

При этом в растворах ингибитора МЕК с концентрацией 10^{-6} М на 3 сутки регенерации достоверного эффекта не наблюдали, но уже на 4 сутки проявилось достоверное подавление роста бластемы на $-34 \pm 13\%$ ($p < 0.001$). Далее на 5 сутки регенерации эффект составлял $-24 \pm 9\%$ ($p < 0.001$) и до 9 дня его значение практически не изменялось.

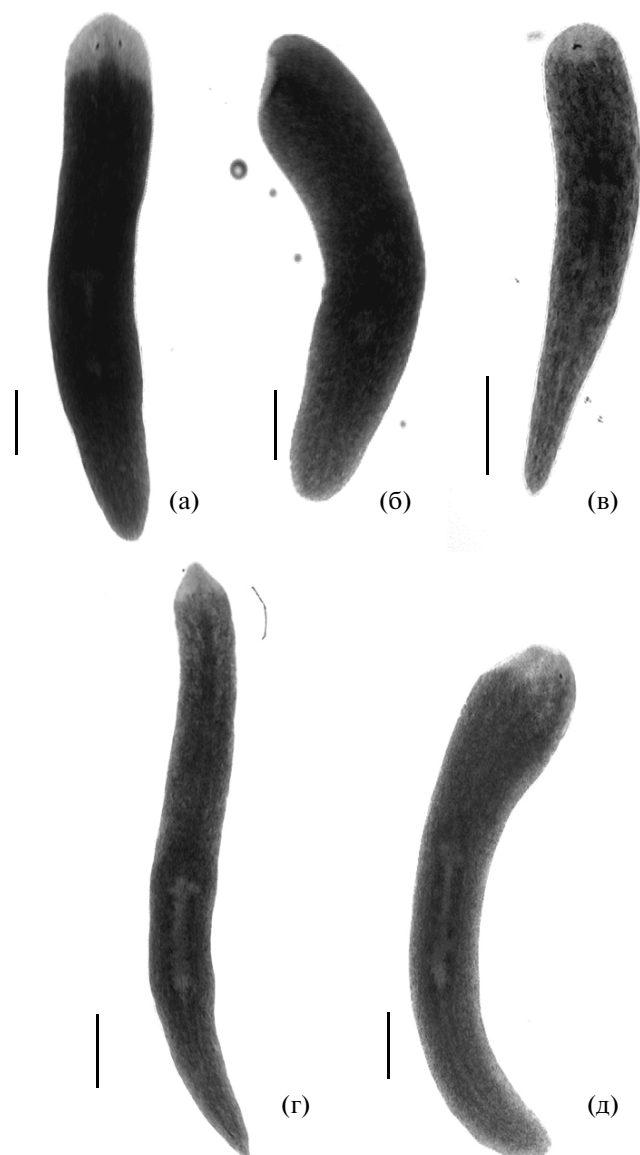


Рис. 3. Фенотипы, проявляющиеся у планарий после воздействия ингибиторов на 9 день регенерации головной части: (а) – фенотип планарий в норме (у животных нормально регенерировавшая голова и развиты глаза), (б) – инкубация в PD 98059 10^{-5} М (у планарий бластема практически отсутствует), (в) – инкубация в PD 98059 10^{-6} М (у животных слабый рост бластемы и формируется только один глаз – наблюдается циклопия), (г) – инкубация в LY 364947 10^{-5} М (наблюдается рост бластемы, но дифференцировка происходит слабо – отсутствуют глаза), (д) – инкубация в LY 364947 10^{-6} М (рост бластемы идет практически нормально, но формируется 1 ассиметричный глаз – наблюдается циклопия). Цена деления на микрофотографиях – 1 мм.

Ингибирующая активность LY 364947 на рост головной бластемы наблюдалась при концентрации действующего вещества 10^{-5} М с максимальными значениями подавления регенерации на 4 день после декапитации (величина составляла $-24 \pm 9\%$ ($p < 0.001$)). Но данный препарат был менее активен, чем PD 98059 при той же концентрации и динамика ингибирования LY 364947 в концентрации 10^{-5} М повторяла динамику при действии ингибитора MEK в концентрации 10^{-6} М (рис. 1). Наиболее интересной оказалась динами-

ка подавления роста головной бластемы препаратом LY 364947 при концентрации 10^{-6} М. Она характеризовалась двумя максимумами ингибирующей активности на 4 день ($-44 \pm 9\%$ ($p < 0.001$)) и 7 день регенерации ($-28 \pm 8\%$ ($p < 0.001$)).

При исследовании воздействия препаратов PD 98059 и LY 364947 на митотическую активность стволовых клеток планарий было обнаружено, что они подавляют их пролиферацию (рис. 2). Так, через 24 ч после декапитации при воздействии ингибитора MEK киназы в концентрации

10^{-5} М число митотических клеток в теле планарий снижалось на $44 \pm 10\%$ ($p < 0.001$), а при инкубации в ингибиторе TGF- β – эффект подавления составлял $31 \pm 10\%$ ($p < 0.001$) (рис. 2).

На рисунке 3 представлены фенотипические эффекты, проявляющиеся у планарий после воздействия ингибиторов митоген-активируемых протеинкиназ. В случае воздействия ингибитора PD 98059 в концентрации 10^{-5} М у планарий размер бласты был минимален, при этом не происходило развитие глаз вплоть до 9 суток регенерации (у контрольных групп глаза появлялись на 2 сутки после декапитации) (рис. 3б). При инкубации животных в растворе ингибитора МЕК в концентрации 10^{-6} М у них все же происходило появление глаз на 6 сутки регенерации, но у 60% планарий наблюдали нарушение морфогенеза – циклопию (рис. 3в).

При воздействии препарата LY 364947 в концентрациях 10^{-5} М у планарий также наблюдалась уменьшенная бластама, у 40% животных на 9 день регенерации отсутствовали глаза (рис. 3г). В концентрации 10^{-6} М у 70% наблюдали нарушение морфогенеза – циклопию, но в отличие от воздействия препарата PD 98059 глаз развивался асимметрично (рис. 3д).

Полученные результаты показывают, что воздействие фармакологических ингибиторов МЕК киназы и рецептора TGF- β у планарий *S. mediterranea* во время регенеративных процессов приводит к существенным нарушениям пролиферации, дифференцировки стволовых клеток и морфогенеза. Вероятно, данные явления связаны именно с ингибированием данных сигнальных каскадов. Так в опубликованной работе Тасаки и соотр. (Tasaki et al., 2011) при ингибировании МЕК киназы у планарии *Dugesia japonica* с помощью фармакологического препарата U0126 также наблюдали замедление роста бласты и нарушение дифференцировки необластов. Причем при понижении концентрации ингибитора у планарий также наблюдали развитие циклопии. В следующей работе авторы показывают связь ERK сигнального каскада и морфогенетических регуляторов – Wnt и β -catenin, которые выступают в качестве создателей морфогенетических градиентов, активирующих или подавляющих активность ERK, что в итоге приводит к регуляции дистопроксимальных паттернов развития, при этом связь ERK и Smad в морфогенезе у плоских червей пока не исследована (Umesono et al., 2013).

Таким образом, представленная нами работа показывает, что фармакологические ингибиторы протеинкиназ МЕК и TGF- β способны нарушать регуляцию пролиферации, дифференцировки необластов и морфогенеза у плоских червей – планарий. Дальнейшие исследования, основанные на РНК интерференции белков участников сигнальных каскадов ERK и TGF- β позволит

продемонстрировать их непосредственную роль в контроле морфогенеза у планарий.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 12-04-32091 мол_а и № 14-04-01517 а.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ермакова О.Н., Ермаков А.М., Турас Х.П. Влияние мелатонина на регенерацию планарий *Girardia tigrina* // Онтогенез. 2009. Т. 40. № 6. С. 466–469.
- Потехина Е.С., Надеждина Е.С. Митоген-активируемые протеинкиназные каскады и участие в них Ste20 – подобных протеинкиназ // Успехи биол. химии. 2002. Т. 42. С. 235–256.
- Турас Х.П., Сахарова Н.Ю. Прижизненная морфометрия планарий // Онтогенез. 1984. Т. 15. № 1. С. 42–48.
- Baguñà J. Planarian neoblasts // Nature. 1981. № 290. P. 14–15.
- Gentile L., Cebrià F., Bartscherer K. The planarian flatworm: an *in vivo* model for stem cell biology and nervous system regeneration // Dis. Model. Mech. 2011. V. 4. № 1. P. 12–19.
- Heldin C.H., Landstrom M., Moustakas A. Mechanism of TGF-beta signaling to growth arrest, apoptosis, and epithelial-mesenchymal transition // Curr. Opin. Cell Biol. 2009. V. 21. P. 166–176.
- Kyriakis J.M., Avruch J. Mammalian MAPK signal transduction pathways activated by stress and inflammation: a 10-year update // Physiol. Rev. 2012. V. 92. № 2. P. 689–737.
- Labbé R.M., Irimia M., Currie K.W. et al. A comparative transcriptomic analysis reveals conserved features of stem cell pluripotency in planarians and mammals // Stem Cells. 2012. V. 30. № 8. P. 1734–1745.
- Newmark P.A., Sanchez Alvarado A. Bromodeoxyuridine specifically labels the regenerative stem cells of planarians // Dev. Biol. 2000. V. 220. P. 142–153.
- Onal P., Grün D., Adamidi C. et al. Gene expression of pluripotency determinants is conserved between mammalian and planarian stem cells // EMBO J. 2012. V. 31. № 12. P. 2755–2769.
- Shibata N., Rouhana L., Agata K. Cellular and molecular dissection of pluripotent adult somatic stem cells in planarians // Dev. Growth Differ. 2010. V. 52. P. 27–41.
- Tasaki J., Shibata N., Nishimura O. et al. ERK signaling controls blastema cell differentiation during planarian regeneration // Development. 2011. V. 138. № 12. P. 2417–2427.
- Umesono Y., Tasaki J., Nishimura Y. et al. The molecular logic for planarian regeneration along the anterior-posterior axis // Nature. 2013. V. 500. № 7460. P. 73–76.
- Yang S.H., Sharrocks A.D., Whitmarsh A.J. MAP kinase signalling cascades and transcriptional regulation // Gene. 2013. V. 513. № 1. P. 1–13.

Study of Possible Involvement of MEK Mitogen-Activated Protein Kinase and TGF- β Receptor in Planarian Regeneration Processes Using Pharmacological Inhibition Analysis

A. M. Ermakov, O. N. Ermakova, and S. A. Ermolaeva

*Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences,
ul. Institutskaya 3, Pushchino, Moscow oblast, 142290 Russia*

e-mail: ao_ermakovy@rambler.ru

Received November 16, 2013; in final form, March 14, 2014

Abstract—Possible involvement of MEK mitogen-activated protein kinase and TGF- β receptor in the processes of regeneration and morphogenesis in freshwater planarian flatworms *Schmidtea mediterranea* was studied using a pharmacological inhibitor analysis. It was found that pharmacological inhibitors of these kinases significantly inhibit the regeneration of the head end of the animals and that this effect is realized due to inhibition of proliferative activity of neoblasts, planarian stem cells. It is shown that the inhibition of the studied protein kinases in regenerating planarians markedly disturbs stem cell differentiation and morphogenesis.

Keywords: planarians, regeneration, MEK and TGF- β protein kinases, pharmacologic inhibitors, stem cells, proliferation, differentiation