

Т.О. Кірпенко, І.М. Кондрічин
Л. І. Остапченко
М.Є. Кучеренко

Київський національний
університет
ім. Тараса Шевченка,
м. Київ

Вплив іонізуючої радіації на регуляцію рецепторних тирозинових протеїнкіназ із лімфоцитів селезінки щурів

Influence of ionizing radiation of receptor tyrosine proteinkinases from lymphocytes of rat spleen

Цель работы: Исследование влияния ионизирующей радиации в сублетальных дозах на регуляцию системы тирозиновых протеинкиназ рецептора эпидермального фактора роста (EGF) в лимфоидных клетках селезенки крыс.

Материалы и методы: Моделью проводимых исследований были лимфоциты селезенки, выделенные на градиенте Ficoll-Paque в контроле и через 12 часов после облучения крыс на установке РУМ-17 в дозах 0,5 и 1 Гр. EGF-рецепторные тирозиновые протеинкиназы получали методом иммуноаффинной хроматографии, об их активности судили по включению ^{32}P из ($\gamma\text{-}^{32}\text{P}$) - АТФ в белковый субстрат. Об активности рецепторных протеинфосфатаз судили по количеству неорганического фосфата, отщепившегося от белкового субстрата.

Результаты: Обобщены результаты изучения механизмов регуляции EGF-рецепторных тирозиновых протеинкиназ в лимфоцитах селезенки крыс в условиях радиационного воздействия. Показано, что тотальное рентгеновское облучение в дозе 1 Гр вызывает гиперактивацию EGF-рецепторных тирозиновых протеинкиназ, что сопровождается интенсификацией процесса автофосфорилирования данного фермента. Радиоиндуцированное гиперфосфорилирование EGF-рецепторных тирозиновых протеинкиназ, в свою очередь, обусловлено возникновением дисбаланса в функционировании системы рецепторных протеинфосфатаз.

Выводы: В формировании реакции иммунокомпетентных клеток селезенки крыс на действие рентгеновского излучения в дозе 1 Гр вовлечены молекулярные механизмы фосфо- и дефосфорилирования EGF-рецепторных тирозиновых протеинкиназ. Показана роль EGF-рецепторных протеинфосфатаз как регуляторного звена функционирования рецептора EGF в лимфоцитах селезенки под воздействием радиации.

Ключевые слова: эпидермальный ростовой фактор, тирозиновые протеинкиназы, протеинфосфатазы, рентгеновское излучение, лимфоциты селезенки.

Objective: To investigate the influence of ionizing radiation in sublethal doses on the regulation of tyrosine proteinkinase system of epidermal growth factor (EGF) receptor in lymphoid cells of rat spleen.

Material and Methods: The model for the study were lymphocytes of the spleen isolated with Ficoll-Paque gradient in the controls and 12 hours after irradiation of the rats with PUM-17 unit at the dose of 0.5 and 1 Gy. EGF-receptor tyrosine proteinkinases were obtained with immunoaffine chromatography, their activity was evaluated according to P-32 activity from g-P-32-ATP in the protein substrate. The activity of receptor proteinphosphatases was evaluated by the amount of inorganic phosphate splitted off the protein substrate.

Results: The results of the study of the mechanisms of EGF-receptor tyrosine proteinkinases in the lymphocytes of the rat spleen at exposure to radiation were generalized. Total x-ray irradiation at a dose of 1 Gy causes hyperactivity of EGF-receptor tyrosine proteinkinases which is accompanied by intensification of the process of autophosphorilizing of this enzyme. Radiation induced hyperphosphorilizing of EGF-receptor tyrosine proteinkinases was caused by the dysbalance in the function of the system of receptor proteinkinases.

Conclusion: Molecular mechanisms of phospho- and dephosphorilizing of EGF-receptor tyrosine proteinkinases take part in the reaction of immune-competent cells of the spleen in rats to the effect of x-ray irradiation at a dose of 1 Gy. The role of EGF-receptor proteinphosphatases as a regulatory mechanism of EGF-receptor function in the lymphocytes of the spleen at exposure to radiation is shown.

Key words: epidermal growth factor, tyrosine proteinkinases, proteinphosphatases, x-ray, spleen lymphocytes.

До імунологічних наслідків, які розвиваються як пізні прояви радіаційних ефектів, належать мієлоїдні та лімфоїдні новоутворення, комплексні імунні захворювання, аутоагресивні імунні реакції та інші дегенеративні стани імунологічної природи [1]. З особливою ретельністю вивчається розвиток мієлоїдних та лімфоїдних неоплазм у відповідь на дію опромінювання [2, 3]. Під час неопластичної трансформації клітин відбувається накопичення великої кількості онкогенних продуктів, які є нормальними або спотвореними елементами сигнальних систем ростових факторів [4]. Різноманітні ростові фактори, в свою чергу, виконують функцію регуляції росту, диференціювання й імунної відповіді лімфоїдних клітин [5]. Необхідно зазначити, що у складний і багатоступеневий процес неопла-

стичної трансформації залучені численні механізми, що включають порушення експресії певних генів, аномальну продукцію цитокінів, гіперекспресію їх рецепторів, спотворення передачі регуляторних сигналів від специфічних рецепторів плазматичної мембрани до ядра клітини і ряд інших [6].

Одна з ланок сигнальної трансдукції ростових факторів включає активацію тирозинових протеїнкіназ, яка часто збільшується під впливом онкогенних продуктів [6]. Питання функціонування рецепторних тирозинових протеїнкіназ за умов розвитку патологічного процесу протягом останніх років є найбільш цікавим для науковців. Показано, що EGF-рецепторні тирозинові протеїнкінази виконують функцію ключової ланки сигнальної трансдукції епидермального фактора росту (EGF) —

одного з найвідоміших цитокінів із широко показаними онкогенними властивостями [7].

Відомо, що регуляторні механізми передачі внутріклітинного сигналу найбільш чутливі до уражуючої дії рентгенівського випромінювання. Тому метою даної роботи було дослідити вплив іонізуючої радіації у сублетальних дозах на регуляцію системи тирозинових протеїнкіназ рецептора EGF у лімфоїдних клітинах селезінки щурів.

Методика дослідження

У дослідженнях використовували білих щурів лінії Вістар обох статей масою 130–150 г. Їх опромінювали на установці РУМ-17 у дозах 0,5 і 1 Гр за умов: потужність дози в повітрі 0,245 Гр/хв, фільтри 1 мм $\text{Cu}+0,5$ мм Al , напруга 200 кВ, сила струму 5 мА, відстань до поверхні шкіри тварин 50 см. Через 12 годин після опромінювання щурів декапітували та вилучали селезінку. Їх лімфоцити отримували центрифугуванням клітинної суспензії на градієнті Ficoll-Paque (густина 1,077) за [8].

Препарат EGF-рецепторних тирозинових протеїнкіназ отримували за рекомендаціями [4] з використанням лінійного градієнта концентрації NaCl при елюції ферменту з BrCN -активованої сефарози «Sigma», попередньо зв'язаної з моноклональними антифосфотирозинними антитілами 4G10 «INSERM». Визначення активності EGF-рецепторних тирозинових протеїнкіназ та вивчення їх автофосфорилування проводили методом [4]. Активність досліджуваного ферменту визначали за включенням ^{32}P з $\beta\text{-}^{32}\text{P}$ -АТФ до білкових субстратів фосфотрансферазної реакції. Радіоактивність вимірювали в толуольному сцинтиляторі ЖС-107, на рідинно-сцинтиляційному лічильнику «Delta» (USA). Питому активність ферментів виражали у пмоль $^{32}\text{P}_n$ за 1 хв на 1 мг білка.

Активність EGF-рецепторних протеїнфосфатаз визначали модифікованим методом [9] за кількістю неорганічного фосфату, відщепленого від білкового субстрату. Питому активність протеїнфосфатаз виражали у пмоль P_n за 1 хв на 1 мг білка.

Автофосфорилування EGF-рецепторних тирозинових протеїнкіназ визначали методом гель-електрофорезу з подальшою авторадіографією [10]. Кінетичний аналіз отриманих результатів виконували за допомогою модифікованої програми «ENSFITTER». Статистичну обробку результатів та побудову графіків проводили на IBM PC ET з використанням стандартних пакетів прикладних програм.

Результати та їх обговорення

Фосфорилування тирозинових залишків розглядається як ключовий компонент регуляції сигнальних послідовностей, який диктує клітині, чи буде вона рости, ділитися, змінювати форму, рухатися, диференціювати, чи загине. Сьогодні встановлено фундаментальну важливість процесів білкового фосфорилування та виявлено зв'язок між дисфункціональним тирозиновим фосфорилуванням і патологічним станом організму за умов променевого ураження. Регуляція тирозинового фосфорилування контролюється за допомо-

гою скоординованої дії тирозинових протеїнкіназ і фосфатаз. Фізіологічна активність рецепторних тирозинових протеїнкіназ за нормальних умов забезпечується компенсаторною дією фосфатаз за автофосфорильованими у відповідь на дію ліганду тирозиновими залишками [6]. Останні являють собою адапторні ланки, за допомогою яких рецепторні тирозинові протеїнкінази взаємодіють зі своїми внутріклітинними мішенями [11]. Таким чином, зв'язування рецепторних тирозинових протеїнкіназ із тригерними молекулами цілком залежить від ступеня їх автофосфорилування.

З метою з'ясування регуляторних механізмів змін активності тирозинових протеїнкіназ у рамках досліджуваної моделі було отримано ферментативний препарат EGF-рецепторних тирозинових протеїнкіназ із мембран лімфоцитів селезінки через 12 годин після опромінювання тварин на колонці з BrCN -активованою сефарозою, зв'язаною з моноклональними антифосфотирозинними антитілами; EGF-рецепторні тирозинові протеїнкінази елюювалися з колонки у вигляді одного виразного піка в інтервалі іонної сили 0,3–0,4 М NaCl . Причому умови елюції ферменту не змінювалися після опромінювання тварин у дозах 0,5 і 1 Гр. Останнє може свідчити про відсутність будь-яких конформаційних змін EGF-рецепторних тирозинових протеїнкіназ під впливом рентгенівського опромінювання в досліджуваних дозах.

Нами було показано, що активність отриманого ферментативного препарату EGF-рецепторних тирозинових протеїнкіназ із лімфоцитів селезінки щурів залишалася майже незмінною за умов дії променевого фактора в дозі 0,5 Гр. Іонізувальне випромінювання в дозі 1 Гр приводило до зростання активності цього ферменту майже в 2 рази (табл. 1).

Щоб визначити ступінь автофосфорилування EGF-рецепторних тирозинових протеїнкіназ, ми провели пластинчастий електрофорез отриманого ферментативного препарату в ПАА-гелі з подальшою авторадіографією. Отримані авторадіографічні дані свідчать про значне збільшення ступеня автофосфорилування EGF-рецепторних тирозинових протеїнкіназ під впливом іонізувального випромінювання в дозі 1 Гр. Аналіз взаємодії ферменту з АТФ в ході реакції автофосфорилування виявив істотні порушення кінетичних констант K_m і V_{\max} під впливом опромінювання. Особливо виражені ці зміни після дії іонізувального випромінювання в дозі 1 Гр. Так, максимальна швидкість фосфотрансферазної реакції та константа Міхаеліса по відношенню до АТФ збільшуються відповідно у 1,6 і 3,6 рази.

Отримані дані свідчать про те, що спорідненість ферменту до АТФ зменшується, але його радіоіндуковане гіперфосфорилування супроводжується зростанням швидкості ферментативної реакції. Отже, можна припустити залучення системи рецепторних фосфатаз до радіоіндукованої зміни ступеня автофосфорилування EGF-рецепторних тирозинових протеїнкіназ.

Таблиця 1 — Активність ферментативного препарату EGF-рецепторних тирозинових протеїнкіназ із лімфоцитів селезінки контрольних та опроміненних тварин ($M \pm m$; $n=3-5$)
 The activity of enzyme preparation of EGF-receptor tyrosine protein kinases from the lymphocytes of the spleen in the control and irradiated animals ($M \pm m$; $n=3-5$)

Стан	Активність ферменту (пмоль/(хв х мг))
Контроль	33,30 ± 0,32
Опромінення в дозі 0,5 Гр	31,95 ± 0,28
Опромінення в дозі 1 Гр	57,76 ± 0,18 *

Примітка. * — $p < 0,05$ порівняно з контролем.

Для з'ясування такого припущення ми протестували активність мембранозв'язаних (рецепторних) тирозинових фосфатаз із використанням їх як субстрату отриманого препарату EGF-рецепторних тирозинових протеїнкіназ (рис. 1). У ході дослідження було виявлено зниження фосфатазної активності в умовах дії радіації. Так, під впливом іонізувального випромінювання в дозі 1 Гр відбувалося дворазове пригнічення активності рецепторних фосфатаз, у дозі 0,5 Гр — зміна активності рецепторних фосфатаз ідентичним чином.

Отже, всі встановлені радіоіндуковані зміни автофосфорилування EGF-рецепторних тирозинових протеїнкіназ свідчать про залучення системи фосфатаз до цього процесу. Тобто визначене нами гіперфосфорилування EGF-рецепторних тирозинових кіназ із лімфоцитів селезінки тварин, опроміненних у дозі 1 Гр, може розглядатися як наслідок часткової радіоіндукованої інактивації фосфатаз. У свою чергу, підвищення активності EGF-рецепторних тирозинових кіназ під впливом іонізувального випромінювання у дозі 1 Гр відбувається внаслідок гіперфосфорилування каталітичних доменів молекул холоферменту. Радіоіндуковане збільшення фосфатитирозинових залишків у складі EGF-рецепторних тирозинових кіназ потенціює зв'язування цих ферментів з їх субстратними мішенями, бо фосфотитирозинові залишки виконують функцію модулів зв'язування сигнальних молекул.

Висновки

1. До формування радіоіндукованої відповіді імункомпетентних клітин селезінки шурів на дію рентгеновського випромінювання в дозі 1 Гр прилучаються молекулярні механізми фосфо- та дефосфорилування EGF-рецепторних тирозинових протеїнкіназ.

2. Під дією променевого фактора EGF-рецепторні протеїнфосфатази відіграють роль регуляторної ланки функціонування рецептора EGF у лімфоцитах селезінки.

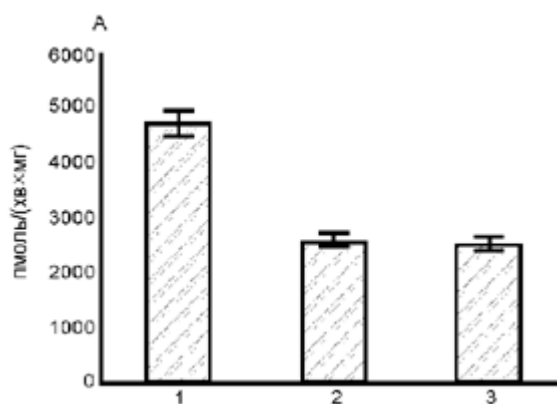


Рис. 1 — Активність [(А) пмоль/(хв х мг)] тирозинових протеїнфосфатаз мембран лімфоцитів селезінки шурів в умовах променевого впливу: 1 — контроль; рентгенівське опромінення: 2 — в дозі 0,5 Гр; 3 — 1 Гр

Fig. 1 — Activity [(A), pmol/(min x mg)] of tyrosine protein phosphatases of the membranes of lymphocytes from the spleen of the rats at radiation exposure: 1 - controls; x-ray exposure: 2 - at a dose of 0.5 Gy; 3 - 1 Gy

1. Takashi M., James S. // *Health Physics*. — 1990. — Vol.59. — P.29-34.
2. Sado T. // *Proc. 6th Int. Cong. Radiat. Res.* — 1979. — №5. — P. 688-697.
3. Little B. // *Carcinogen*. — 2000. — Vol. 21. — P.397-404.
4. Boutin J. C. // *J. of Chromatogr.* — 1996. — Vol.684. — P.179-199.
5. Ullrich A., Schlessinger J. // *Cell*. — 1990. — Vol.61. — P.203-212.
6. Liebow C., Kamer A.R. // *The Cancer J.* — 1992. — Vol.5, №4. — P.315-319.
7. Burke F., Balkwill F.R., Kossodo S. // *Cytokines in Health and Disease*, 2-nd ed. New York: Marcel Dekker, Inc. 1997. — P.169-185.
8. Boyum A. // *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* — 1968. — Vol.21. — P. 28-30.
9. Imbert V., Peyron J.-F., Farahi D. et al. // *Biochem. J.* — 1994. — Vol.297. — P. 163-173.
10. Laemmli U. K. // *Nature*. — 1970. — Vol. 227. — P. 680-685.
11. Hardrer K., Owen P., Wong L. et al. // *Biochem. J.* — 1994. — Vol. 298. — P. 395-401.

Дата надходження: 28.09.2000.

Адреса для листування:

Кірпенко Т.О.,
 вул. Володимирська, 64, каф. біохімії біологічного ф-ту,
 Київський національний університет ім. Тараса Шевченка,
 Київ, 01033, Україна