ДОКЛАДЫ АКАДЕМИИ НАУК, 2007, том 417, № 2, с. 1–3

ФИЗИОЛОГИЯ

УДК 576.321.36

РОЛЬ ТИРОЗИНКИНАЗ И ТИРОЗИНФОСФАТАЗ В ДЕЙСТВИИ ОКИСЛЕННОГО ГЛУТАТИОНА И ПРЕПАРАТА ГЛУТОКСИМ НА ВНУТРИКЛЕТОЧНУЮ КОНЦЕНТРАЦИЮ Ca^{2+} В МАКРОФАГАХ

© 2007 г. З. И. Крутецкая, О. Е. Лебедев, Л. С. Курилова, В. Г. Антонов, академик А. Д. Ноздрачев

Поступило 19.02.2007 г.

Одной из основных окислительно-восстановительных систем в клетках является система глутатион/окисленный глутатион (GSH/GSSG). Ранее нами было показано, что GSSG и его синтетический аналог препарат глутоксим® (ФАРМАВАМ, Москва) увеличивают внутриклеточную концентрацию Ca^{2+}, $[Ca^{2+}]_i$, вызывая мобилизацию Ca^{2+} из тапсигаргин-чувствительных Ca^{2+}-депо в перитонеальных макрофагах крысы [1]. В то же время механизмы, опосредующие регуляторное действие GSSG и Глутоксима на $[Ca^{2+}]_i$, остаются неясными.

На клетках эпидермоидной карциномы человека линии А431 установлено, что GSSG и глутоксим вызывают трансактивацию рецептора эпидермального фактора роста и активацию его собственной тирозинкиназной активности [2, 3]. В перитонеальных макрофагах также идентифицированы рецепторы с собственной тирозинкиназной активностью [4]. Эти рецепторные тирозинкиназы, содержащие в экстраклеточных доменах участки, богатые цистеином, также могут являться мишенями для GSSG и глутоксима. Кроме того, известно, что окислительный стресс и уменьшение соотношения GSH/GSSG внутри клетки вызывают изменение активности редокс-чувствительных ферментов, в первую очередь тирозинкиназ и тирозинфосфатаз [5, 6], что приводит к увеличению фосфорилирования белков по тирозину.

Для выявления возможной роли фосфорилирования по тирозину в действии GSSG и глутоксима на $[Ca^{2+}]_i$ в перитонеальных макрофагах крысы мы исследовали влияние на Ca^{2+}-ответ, индуцируемый GSSG или глутоксимом, двух структурно различных ингибиторов тирозинкиназ – генистейна и метил-2,5-дигидроксициннамата (МДЦ), а также ингибитора тирозинфосфатаз ортованадата Na. Подробно процедура культивирования макрофагов и автоматизированная установка для измерения $[Ca^{2+}]_i$ с использованием флуоресцентного зонда Fura-2AM описаны ранее [7]. Эксперименты проводили при комнатной температуре 20–22°С на 2–3 сут культивирования клеток. На рисунках представлены результаты, полученные для глутоксима. Аналогичные данные получены при использовании GSSG (100 мкг/мл).

Показано, что инкубация макрофагов в течение 20 мин с 100 мкг/мл глутоксима существенно повышает $[Ca^{2+}]_i$, что отражает мобилизацию Ca^{2+} из внутриклеточных Ca^{2+}-депо. Добавление в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} вызывает вход Ca^{2+}, обусловленный, по-видимому, опустошением Ca^{2+}-депо (рис. 1а). Добавление 100 мкМ генистейна (рис. 1а) или 25 мкМ МДЦ (не показано) на фоне развившегося входа Ca^{2+} полностью подавляет увеличение $[Ca^{2+}]_i$, вызванное глутоксимом, и возвращает $[Ca^{2+}]_i$ к базальному уровню. Кроме того, предварительная инкубация макрофагов с 100 мкМ генистейна в течение 7 мин до введения 100 мкг/мл глутоксима практически полностью подавляет увеличение $[Ca^{2+}]_i$, вызываемое глутоксимом, и подавляет вход Ca^{2+} (рис. 1б). Ингибирование входа Ca^{2+}, вызываемого глутоксимом, при действии генистейна или МДЦ согласуется с полученными нами ранее данными о том, что генистейн и МДЦ подавляют вход Ca^{2+}, индуцируемый АТФ, УТФ, тапсигаргином и циклопьязониковой кислотой в перитонеальных макрофагах крысы [7].

Общий уровень фосфорилирования белков по тирозину в клетке контролируется противоположным действием тирозинкиназ и тирозинфосфатаз. Увеличение уровня фосфорилирования может быть вызвано повышением активности тирозинкиназ или уменьшением активности тирозинфосфатаз [8, 9].

Для выявления возможной роли тирозинфосфатаз в увеличении $[Ca^{2+}]_i$ под действием GSSG или глутоксима мы использовали ингибитор тирозинфосфатаз ортованадат Na, изменяющий баланс между активностью тирозинкиназ и тиро-

Санкт-Петербургский государственный университет

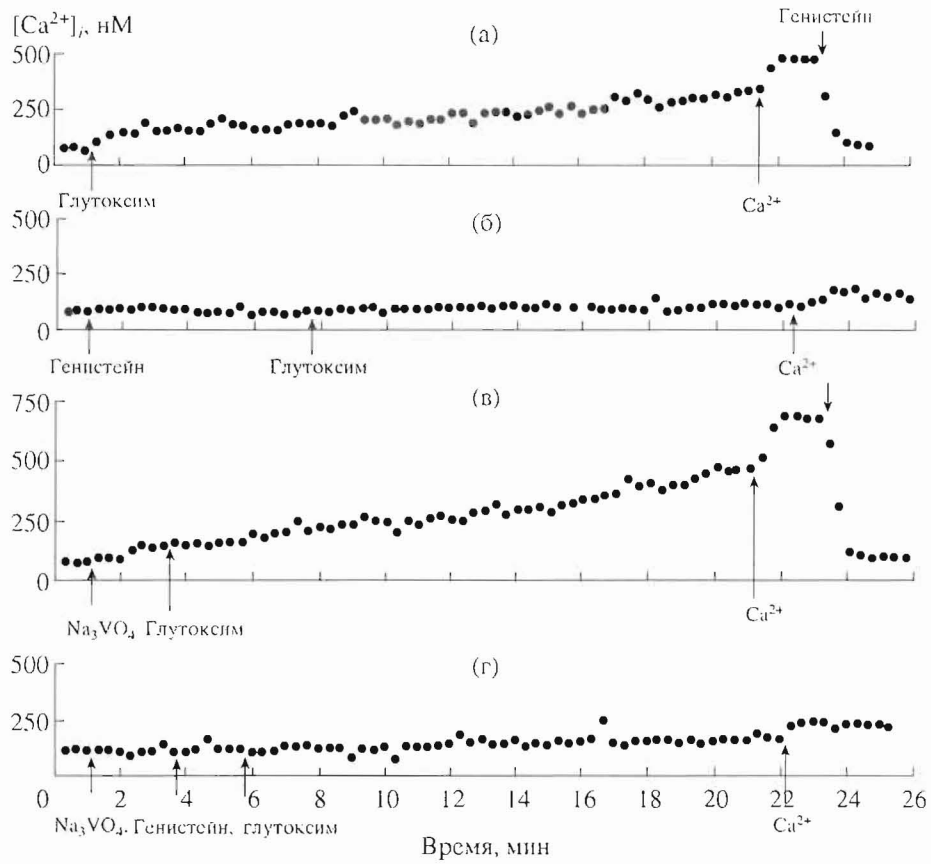

Рис. 1. Влияние генистейна и ортованадата Na (Na_3VO_4) на эффект глутоксима на $[Ca^{2+}]_i$ в перитонеальных макрофагах. Каждая регистрация получена для группы из 40–50 клеток и представляет собой типичный вариант для 3–7 экспериментов. а–г – см. в тексте.

зинфосфатаз. Показано, что добавление 50 мкМ ортованадата Na за 2 мин до введения 100 мкг/мл глутоксима вызывает некоторое усиление вызванного глутоксимом Ca^{2+}-ответа, связанного с мобилизацией Ca^{2+} из депо, а также последующего входа Ca^{2+} из наружной среды (рис. 1в). Добавление генистейна на фоне развившегося входа Ca^{2+} приводит к возвращению $[Ca^{2+}]_i$ к базальному уровню. Таким образом, предварительная обработка клеток ортованадатом Na усиливает индуцированный глутоксимом вход Ca^{2+}, но не предотвращает последующее ингибирование входа Ca^{2+} генистейном. Это согласуется с полученными нами ранее данными о том, что предынкубация клеток с ортованадатом Na усиливает АТФ-индуцированный вход Ca^{2+}, но не предотвращает последующее ингибирование входа Ca^{2+} генистейном [7]. Усиление входа Ca^{2+} ортованадатом Na подтверждает важность активации тирозинкиназ для стимуляции входа Ca^{2+}.

На рис. 1г показано совместное действие генистейна и ортованадата Na на увеличение $[Ca^{2+}]_i$, вызываемое глутоксимом. Клетки инкубировали с 50 мкМ ортованадата Na и 100 мкМ генистейна, после чего на клетки воздействовали 100 мкг/мл глутоксима и через 16 мин вводили в наружную среду 2 мМ Ca^{2+}. Наблюдается подавление обеих фаз Ca^{2+}-ответа, вызываемого глутоксимом. Таким образом, ортованадат Na не предотвращает ингибирование входа Ca^{2+} генистейном и в том случае, когда оба блокатора добавляются до приложения глутоксима.

Можно предположить, что стимуляция входа Ca^{2+} под действием GSSG или глутоксима обусловлена активацией тирозинкиназ, повышением фосфорилирования по тирозину Ca^{2+}-канала в плазматической мембране или связанного с каналом регуляторного белка. Возможно также, что вызываемая глутоксимом или GSSG мобилизация Ca^{2+} из депо связана с фосфорилированием по тирозину и активацией канала Ca^{2+}-выброса рецептора инозитол-1,4,5-трифосфата в мембране эндоплазматического ретикулума [10].

Мишенями для ковалентной модификации GSSG или глутоксимом могут быть сами тирозинфосфатазы, содержащие в каталитическом доме-

не функционально важный остаток цистеина, который должен быть в восстановленном состоянии для осуществления фосфатазной активности [8, 11].

Таким образом, нами впервые показано участие тирозинкиназ и тирозинфосфатаз в увеличении $[Ca^{2+}]_i$, вызываемом GSSG или глутоксимом, в перитонеальных макрофагах крысы. Учитывая, что генистейн и МДЦ блокируют широкий спектр тирозинкиназ, можно предположить, что в регуляторном действии глутоксима или GSSG на $[Ca^{2+}]_i$ могут участвовать как рецепторные, так и цитоплазматические тирозинкиназы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Крупецкая З.И., Лебедев О.Е., Курилова Л.С. и др.* // ДАН. 2007. Т. 412. № 5. С. 1–4.
2. *Бурова Е.Б., Василенко К.П., Антонов В.Г., Никольский Н.Н.* // ДАН. 2005. Т. 404. № 1. С. 122–124.
3. *Василенко К.П., Бурова Е.Б., Антонов В.Г., Никольский Н.Н.* // Цитология. 2006. Т. 48. № 6. С. 500–507.
4. *Correll P.H., Morrison A.C., Lutz M.A.* // J. Leukoc. Biol. 2004. V. 75. P. 731–737.
5. *Staal F.J.T., Anderson M.T., Staal G.E.J. et al.* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1994. V. 91. P. 3619–3622.
6. *Rao R.K., Li L., Baker R.D. et al.* // Amer. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 2000. V. 279. P. G332-G340.
7. *Крупецкая З.И., Лебедев О.Е., Тюшев В.Е. и др.* // Цитология. 1997. Т. 39. № 2/3. С. 164–176.
8. *Fischer E.H., Charbonneau H., Tonks N.K.* // Science. 1991. V. 253. P. 401–406.
9. *Hunter T.* // Biochem. Soc. Trans. 1996. V. 24. P. 307–327.
10. *Jayaraman T., Ondrias K., Ondriasova E., Marks A.R.* // Science. 1996. V. 272. P. 1492–1494.
11. *Denu J.M., Stuckey J.A., Saper M.A., Dixon J.E.* // Cell. 1996. V. 87. P. 361–364.