

**ТРАНСАКТИВАЦИЯ РЕЦЕПТОРА ЭПИДЕРМАЛЬНОГО ФАКТОРА
РОСТА ОКИСЛЕННЫМ ГЛУТАТИОНОМ И ЕГО
ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИМ АНАЛОГОМ ГЛУТОКСИМ®
В КЛЕТКАХ А431**

© 2005 г. Е. Б. Бурова, К. П. Василенко, В. Г. Антонов, академик Н. Н. Никольский

Поступило 28.03.2005 г.

Гаммаглутамилцистеинилглицин (GSH и GSSG, восстановленный и окисленный глутатион) является распространенным пептидом в клетках аэробных организмов, причем в основном в восстановленной форме. По современным представлениям для регуляции многих клеточных процессов, включая передачу сигнала, система окисленного и восстановленного глутатиона наиболее важна из всех известных редокс-систем в клетке [1]. Внутриклеточный GSH является сквенджером свободных радикалов и, как антиоксидант, защищает клеточные мембраны от окислительного стресса, ДНК от радиации и УФ-облучения и клетку от действия токсичных ксенобиотиков (лекарства, канцерогены и т.д.) [2, 3]. GSH способен образовывать дисульфидные связи с остатками цистеина белков, на чем основан механизм “S-глутатионилирования”, имеющий важное значение в регуляции функций белков. Защищая белки от денатурации, вызываемой окислением их тиольных групп во время стресса, GSH превращается в дисульфид глутатиона GSSG. Установлено также, что изменение в окислительно-восстановительном состоянии клетки необходимо как регуляторный фактор для активации ряда транскрипционных факторов (AP-1, NF-κB, STAT) и протеинтирозинфосфатаз (PTB-1B) [4, 5]. Интересно отметить также парадоксальную способность GSH инициировать окислительные процессы в клетке [6].

Анализ литературы показывает, что подавляющее большинство работ посвящено изучению различных аспектов действия восстановленного глутатиона. Механизм действия на клетки окисленного глутатиона до сих пор не изучался. Наряду с GSSG предметом особого интереса в нашей работе был его синтетический аналог Глутоксим® (ФАРМА-ВАМ, Москва). Препарат Глутоксим® разрешен к применению как лекарственное

средство в классе иммуностимуляторов. Показано, что Глутоксим® обладает иммунокорректирующей и гемостимулирующей активностями, увеличивает резистентность клеток и организма в целом при локальных и генерализованных хронических инфекциях, увеличивает эффективность химиотерапии в отношении внутриклеточных инфекций, устраняет проявление неспецифического синдрома хронических заболеваний.

Учитывая вышесказанное, можно считать, что исследование механизма действия окисленного глутатиона и его фармакологического аналога несомненно актуально, поскольку могло бы пролить свет на внутриклеточные пути передачи сигнала от этих агентов, в частности на предполагаемое участие рецептора эпидермального фактора роста (ЭФР) в этом процессе. В настоящее время активно дискутируется вопрос о трансактивации рецептора ЭФР при воздействии на клетку различных стимулов, не являющихся непосредственными лигандами рецептора ЭФР. Трансактивация означает ЭФР-независимую активацию рецептора ЭФР в результате действия активаторов рецепторов – цитокинов и рецепторов, сопряженных с G-белками, а также различных стрессовых факторов [7]. По современным представлениям трансактивация рецептора ЭФР играет важную роль в реакции клеток на различные внешние воздействия. В данной работе основное внимание уделено изучению трансактивации рецептора под действием GSSG и препарата Глутоксим®, а также активации обычно регулируемых рецептором ЭФР транскрипционных факторов STAT1 и STAT3.

В работе были использованы клетки эпидермоидной карциномы человека линии А431, полученные из Российской коллекции клеточных культур (Институт цитологии РАН). Перед опытом клетки в течение суток выдерживали в среде с пониженным содержанием сыворотки для удаления присутствующих в ней факторов роста и снижения базального уровня активации сигнальных белков. Приготовление клеточных лизатов, электрофоретическое разделение белков и имму-

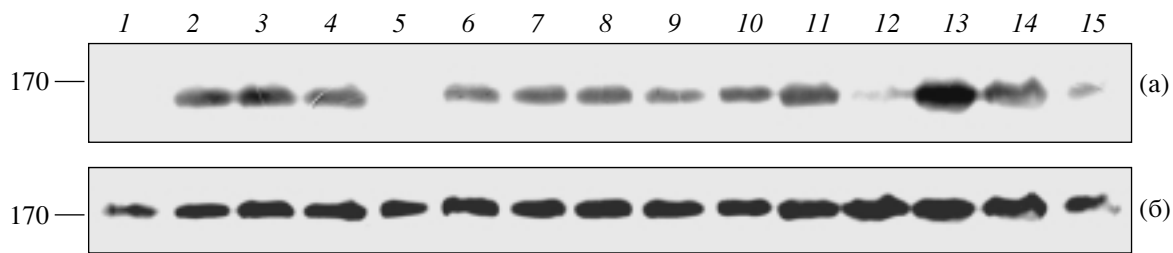


Рис. 1. Активация рецептора ЭФР при действии на клетки A431 окисленного глутатиона и препарата Глутоксим[®]. а - иммуноблот электрофоретически разделенных тотальных клеточных лизатов проводили антителами против фосфотирозина (PY20, "Sigma"); б - та же мембрана после удаления антител и последующего выявления рецептора ЭФР специфическими антителами (mAb 2760, "Sigma"). 1 - необработанные клетки, 2-8 - клетки инкубировали с окисленным глутатионом: в концентрации 1 мкг/мл 2-5 или 10 мкг/мл 6-8 в течение 5 мин (2, 6, 10 мин (3, 7), 30 мин (5) и 1 ч (4, 8). Клетки инкубировали с препаратом Глутоксим[®] (9-15): в концентрации 1 мкг/мл (9-12) или 10 мкг/мл (13-15) в течение 5 мин (9, 13), 10 мин (10, 14), 30 мин (12) и 1 ч (11, 15). Слева указана мол. масса белковых маркеров в кДа.

ноблоттинг осуществляли, как описано ранее [8, 9]. Высокочувствительный метод усиленной хемилюминесценции (ECL, "Amersham") применяли для выявления антигенов в иммуноблоте.

Добавление окисленного глутатиона в концентрации 1 или 10 мкг/мл к клеткам A431 вызывало активацию рецептора ЭФР (рис. 1а). Глутоксим[®] оказывал аналогичное действие на рецептор ЭФР. Изучение активации тирозинкиназы рецептора ЭФР в зависимости от времени действия исследуемых препаратов показало, что степень фосфори-

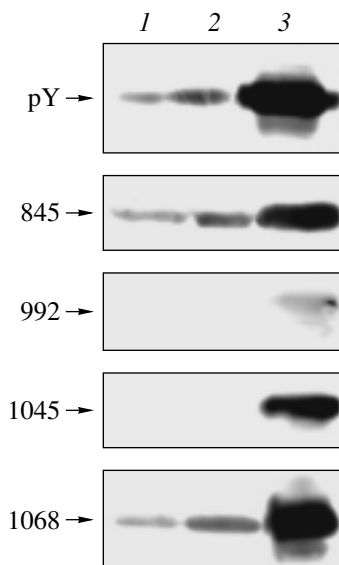


Рис. 2. Выявление сайтов фосфорилирования по тирозину рецептора ЭФР при действии окисленного глутатиона и ЭФР. Необработанные клетки (1), клетки инкубировали с окисленным глутатионом (10 мкг/мл) в течение 5 мин (2) или ЭФР (200 нг/мл) в течение 15 мин (3). Иммуноблот проводили антителами против фосфотирозина (PY20, "Sigma") или антителами против фосфорилированных по тирозину сайтов рецептора (phospho-EGF receptor antibody sampler kit, Cell Signaling) как отмечено слева: в положениях 845, 992, 1045, 1068.

рования рецептора, которая является показателем активности его тирозинкиназы, максимальна после 5-10 мин и 1 ч воздействия. Временная динамика активации имеет волнообразный характер: после 30 мин воздействия препаратов наблюдается снижение уровня активации рецептора ЭФР до контрольного значения. Таким образом, впервые продемонстрирована трансактивация рецептора ЭФР при действии на клетки окисленного глутатиона и его фармакологического аналога Глутоксим[®].

Сравнение сайтов фосфорилирования цитоплазматического участка рецептора ЭФР при действии на клетки окисленного глутатиона и ЭФР продемонстрировало существенные различия в их активации (рис. 2). В контрольных (необработанных препаратами) клетках наблюдается небольшое базальное фосфорилирование остатков тирозина в положениях 845 и 1068 и отсутствует фосфорилирование сайтов 992 и 1045. Окисленный глутатион вызвал заметное увеличение уровня фосфорилирования остатков тирозина в положениях 845 и 1068 по сравнению с контрольным уровнем и не стимулировал фосфорилирование сайтов 992 и 1045. Фосфорилирование остатка тирозина 845 приводит, как известно, к дополнительной активации тирозинкиназы рецептора ЭФР, а сайт 1068 служит посадочной площадкой для связывания фактора STAT3 и адаптерного белка GRB2. Действие ЭФР привело к сильному фосфорилированию сайтов 845, 1045 и 1068 и незначительному увеличению фосфорилирования сайта 992, что совпадает с данными литературы [10]. Следовательно, существует различие в спектре фосфорилирования остатков тирозина рецептора ЭФР при действии его специфического лиганда ЭФР и окисленного глутатиона.

Далее была изучена активация транскрипционных факторов STAT1 и STAT3, участвующих в передаче сигнала от рецептора ЭФР. Обнаружено, что транскрипционный фактор STAT3 активируется при действии окисленного глутатиона и препа-

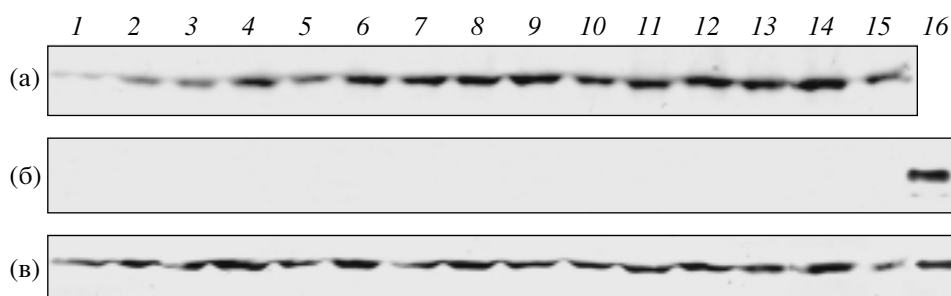


Рис. 3. Фосфорилирование транскрипционных факторов STAT3 и STAT1 при действии окисленного глутатиона и препарата Глутоксим®. а – В иммуноблоте использовали специфические антитела против фосфорилированного по тирозину 705 STAT3 (pTyr705 STAT3 pAb, Cell Signaling). 1 – 15 – те же условия обработки клеток, что и на рис. 1, 16 – клетки обрабатывали ЭФР в концентрации 200 нг/мл в течение 15 мин. б – В иммуноблоте использовали специфические антитела против фосфорилированного по тирозину 701 STAT1 (pTyr701 STAT1 pAb, Cell Signaling). в – Та же мембрана после удаления антител и последующего выявления в иммуноблоте STAT1 с использованием специфических антител (STAT1 mAb, BD Translab).

рата Глутоксим®, хотя и в значительно меньшей степени, чем при действии ЭФР (рис. 3а). Не выявлено никакой активации транскрипционного фактора STAT1 при действии исследуемых препаратов в отличие от действия ЭФР (рис. 3б). Это совпадает с полученными нами результатами анализа фосфорилирования рецептора ЭФР (рис. 2), согласно которым отсутствует фосфорилирование сайтов 992 и 1045 при действии окисленного глутатиона. Как известно, именно эти сайты необходимы для активации фактора STAT1 при действии ЭФР. Выявленное увеличение активации фактора STAT3 при действии окисленного глутатиона и препарата Глутоксим® хорошо коррелирует с продемонстрированной активацией сайта 1068, который обеспечивает взаимодействие рецептора ЭФР и STAT3.

Приведенные результаты демонстрируют возможность трансактивации рецептора ЭФР новым стимулирующим агентом – экстраклеточным окисленным глутатионом. Действие препарата Глутоксим® не отличалось от действия окисленного глутатиона на активацию рецептора ЭФР и фактора STAT3. Однако механизм активации рецептора ЭФР при действии применявшихся препаратов требует дальнейшего изучения. Также представляется перспективным всестороннее исследование роли активации рецептора ЭФР и зависимых от него путей передачи сигнала для объяснения фармакологической эффективности препарата Глутоксим®.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 02-04-49976), ФЦП “ИРПНРНТ” (Контракт № 43.073.1.1.2507) и Программы исследований ведущих научных школ (НШ-2231.2003.4).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Filomeni G., Rotilio G., Ciriolo M.R.* // *Biochem. Pharmacol.* 2002. V. 64. P. 1057–1064.
2. *Heales S.J., Bolanos J.P., Stewart V.C. et al.* // *Biochim. et biophys. acta.* 1999. V. 1410. P. 215–228.
3. *Meister A., Anderson M.E.* // *Ann. Rev. Biochem.* 1983. V. 52. P. 711–725.
4. *Lee S.-R., Kwon K.-S., Kim S.-R., Rhee S.G.* // *J. Biol. Chem.* 1998. V. 273. P. 15366–15372.
5. *Thannickal V.J., Fanburg B.L.* // *Amer. J. Physiol. Lungm. Cell. Mol. Physiol.* 2000. V. 279. P. L1005–L1028.
6. *Pompella A., Visvikis A., Paolicchi A. et al.* // *Biochem. Pharmacol.* 2003. V. 66. P. 1499–1503.
7. *Gschwind A., Zwick E., Prenzel N. et al.* // *Oncogene.* 2001. V. 20. P. 1594–1600.
8. *Василенко К.П., Бурова Е.Б., Цупкина Н.В., Никольский Н.Н.* // *Цитология.* 1998. Т. 40. С. 1063–1069.
9. *Василенко К.П., Бурова Е.Б., Н.А. Виноградова, Никольский Н.Н.* // *Цитология.* 2004. Т. 46. С. 1025–1029.
10. *Olayioye M.A., Neve R.M., Lane H.A., Hynes N.E.* // *EMBO J.* 2000. V. 19. P. 3159–3167.