



УДК 577.152.271*112.04

СВЕТ ИНГИБИРУЕТ ТИРОЗИНКИНАЗНУЮ АКТИВНОСТЬ В НАРУЖНЫХ СЕГМЕНТАХ ПАЛОЧЕК СЕТЧАТКИ *in vitro*

© 2001 г. А. М. Шолух^{**}, И. Д. Артамонов^{**}, Л. А. Баранова^{*},
В. М. Липкин^{**}, И. Д. Волотовский^{*}

^{*} Институт фотобиологии НАНБ, 220072, Минск, ул. Академическая, 27, Беларусь;

^{**} Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117977 ГСП, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 28.12.2000 г. Принята к печати 15.06.2001 г.

Установлено, что кратковременное облучение светом (10 мин) адаптированных к темноте наружных сегментов палочек (Т-НСП) сетчатки приводит к трехкратному ингибированию тирозинкиназной активности. Тирозинкиназная активность в НСП, выделенных из обесцвеченных сетчаток, ниже, чем в адаптированных к темноте НСП, на 30%. Длительное освещение (60 мин) Т-НСП приводит к восстановлению тирозинкиназной активности до уровня, соответствующего наружным сегментам из обесцвеченных сетчаток.

Ключевые слова: тирозинкиназа; наружные сегменты палочек сетчатки; фоторегуляция.

ВВЕДЕНИЕ

Нерецепторные тирозинкиназы (нРТК, КФ 2.7.1.122) принимают участие в процессах метаболизма, дифференцировке, росте, выживании клеток, апоптозе [1], являясь ключевыми звеньями сигнальных каскадов, регулирующих экспрессию определенных генов [2]. В последнее время появились работы, посвященные участию нРТК в трансдукции сигнала рецепторов, связанных с G-белками [3].

Одним из наиболее изученных мембранных рецепторов, ассоциированных с G-белками, является родопсин фоторецепторной клетки. Недавно в наружных сегментах палочки (НСП) сетчатки обнаружена тирозинкиназная активность, не связанная с плазматической мембраной [4], а также показана возможность фосфорилирования cGMP-чувствительных каналов по остаткам тирозина [5]. Кроме того, Оказава и соавторы показали повышение уровня экспрессии тирозинкиназных генов *trkD* и *trkC* при освещении и снижение его при темновой адаптации сетчатки цыпленка [6]. Эти данные указывают на то, что в НСП сетчатки могут присутствовать нерецепторные тирозинкиназы, активность которых может регулироваться светом.

Сокращения: нРТК – нерецепторные тирозинкиназы; НСП – наружные сегменты палочек сетчатки; Src-киназа – вирус саркомы Рауса; Csk-киназа – C-концевой фрагмент киназы вируса саркомы Рауса.

[#] Автор для переписки (тел.: +375 (17) 284-22-52; факс: +375 (17) 284-23-59; эл. почта: sholukh@bas07.bas-net.by).

В настоящей работе проведено исследование влияния света на тирозинкиназную активность НСП сетчатки.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для изучения влияния света на тирозинкиназную активность в НСП использовали два варианта освещения: 1) освещение НСП из адаптированных к темноте сетчаток непосредственно в ходе измерения тирозинкиназной активности; 2) длительное (в течение 30 мин) освещение сетчатки. Первый вариант позволяет получить информацию о быстрых изменениях тирозинкиназной активности, второй – дает возможность судить об адаптационных изменениях активности нРТК в фоторецепторе. В опытах использовали три полученных препарата НСП: **Т-НСП** – из адаптированных к темноте сетчаток, **З-НСП** – из засвеченных в процессе эксперимента Т-НСП и **О-НСП** – из обесцвеченных сетчаток, полученных после длительного освещения.

Результаты измерения тирозинкиназной активности в различных препаратах НСП представлены на рис. 1. Видно, что облучение светом Т-НСП в ходе проведения тирозинкиназной реакции приводит к ингибированию фермента как в З-НСП (почти 3-кратному), так и в О-НСП. При этом тирозинкиназная активность в О-НСП остается примерно в 2 раза выше, чем в З-НСП. Таким образом, в наружных сегментах, выделенных из освещенных сетчаток, нРТК либо ингибируется в меньшей степени, либо происходит ее активация по сравнению с наблюдаемым для З-НСП.

Оба варианта могут успешно реализоваться, если в НСП присутствует несколько различных нерецепторных тирозинкиназ. Известно, например, что первоначальное повышение активности киназ src-семейства в ответ на стимуляцию впоследствии регулируется за счет активации Csk-киназы, которая фосфорилирует Src-киназу по остатку Tyr в С-концевой области, вызывая ингибирование последней [7].

Чтобы установить, влияет ли способ освещения на уровень снижения тирозинкиназной активности, препараты О-НСП и З-НСП инкубировали при постоянном освещении в течение 3 ч. В определенные моменты времени (см. рис. 2) измеряли тирозинкиназную активность. Можно видеть, что на начальных стадиях освещения тирозинкиназная активность в З-НСП была ниже, чем в О-НСП. При дальнейшей инкубации препаратов на свету (вплоть до 60 мин), происходило увеличение активности в З-НСП до уровня О-НСП, при этом тирозинкиназная активность О-НСП оставалась практически неизменной. Далее происходило снижение активности в обоих препаратах.

Индукцированное светом восстановление активности в засвеченных непосредственно в ходе опыта НСП (З-НСП) до уровня О-НСП указывает на то, что механизмы, определяющие этот процесс, реализуются именно в наружном сегменте фоторецепторной клетки. Начальное ингибирование, а затем увеличение и снижение уровня тирозинкиназной активности препаратов НСП свидетельствуют, по-видимому, о наличии нескольких нерецепторных тирозинкиназ, которые активируются и ингибируются светом на разных стадиях облучения. Наблюдаемый эффект может иметь значение не только для адаптации фоторецептора позвоночных к продолжительному освещению. Обладая высокой чувствительностью, НСП может повреждаться при длительном воздействии яркого света. Известно, что многие нерецепторные тирозинкиназы принимают участие в ответе клеток на стресс [8]. Сложное проявление тирозинкиназной активности НСП при освещении может быть одним из звеньев цепи защитных реакций фоторецептора в стрессовых условиях.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Наружные сегменты палочек получали из свежих адаптированных к темноте глаз быка ультрацентрифугированием в линейном градиенте плотности сахарозы по методу Папермастера и Дрейера [9].

Тирозинкиназную активность определяли при 37°C в 50 мкл среды следующего состава: 25 мМ НЕРЕС-NaOH (рН 7.4), 5 мМ MgCl₂, 5 мМ MnCl₂, 100 мкМ Na₃VO₄, 0.1% Тритон X-100 и 5 мкМ [γ -³²P]АТР (1 мкКи на пробу). В качестве субстрата для фосфорилирования использовали синтети-

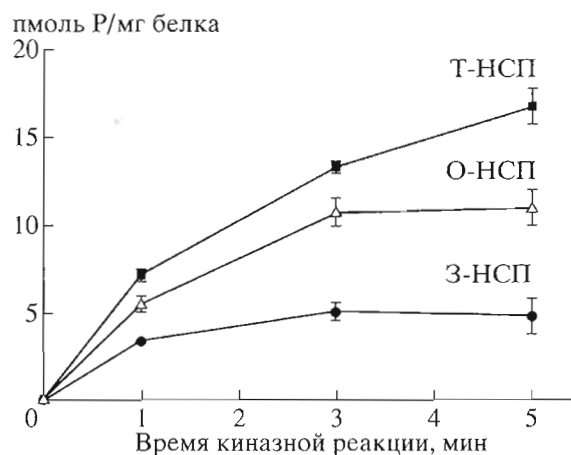


Рис. 1. Определение тирозинкиназной активности в различных препаратах НСП. Т-НСП – выделены из адаптированных к темноте НСП; О-НСП – НСП из обесцвеченных сетчаток; З-НСП – Т-НСП, засвеченные в процессе эксперимента. Освещение О-НСП и З-НСП проводили на протяжении всего времени измерения активности фермента, для З-НСП свет включали в момент добавления субстратов тирозинкиназы; Т-НСП инкубировали в темноте.

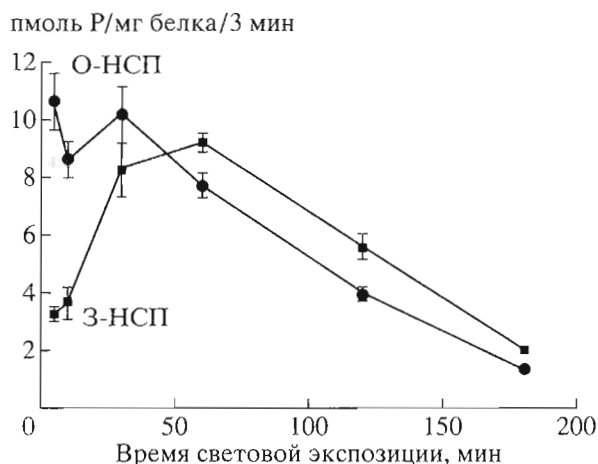


Рис. 2. Зависимость активности тирозинкиназы НСП от продолжительности освещения. НСП засвечивали в течение 180 мин. В указанные моменты времени добавляли субстраты тирозинкиназы и проводили фосфотрансферную реакцию в течение 3 мин.

ческий сополимер глутамата и тирозина – poly(E₄Y) в концентрации 4.39 мкМ. Все пробы содержали по 100 мкг общего белка НСП. Через указанные интервалы времени после внесения субстрата реакцию останавливали, перенося среду инкубации на бумажные фильтры (1.8 × 1.8 см) Whatman 3MM, которые подвергали дальнейшей отмывке, как описано [10]. Активность тирозинкиназы оценивали в количестве фосфата (пмоль), включенного в poly(E₄Y) в 1 мин в расчете на 1 мг белка. Освещение сетчаток и НСП проводили при 800 лк.

Концентрацию белка измеряли по методу Брэдфорд [11].

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (проект № Б99-028).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Татосян А.Г., Мизенина О.А. // Биохимия. 2000. Т. 65. С. 57–67.
2. Scholz G., Martinerie C., Perdal B. // Moll. Cell Biol. 1996. V. 16. P. 481–486.
3. van Biesen T., Luttrell M., Hawes B.E., Lefkowitz R.J. // Endocrine Rev. 1996. V. 17. P. 698–714.
4. Шолух А.М., Артамонов И.Д., Баранова Л.А., Волотовский И.Д. // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. 1998. Т. 42. С. 79–82.
5. Molokanova E., Trivedi B., Savchenko A., Kramer R. // J. Neurosci. 1997. V. 17. P. 9068–9076.
6. Okazawa H., Kamei M., Imafuku I., Kanazawa I. // Oncogene. 1994. V. 9. P. 1813–1818.
7. Okada M., Nakagawa H. // J. Biol. Chem. 1989. V. 264. P. 20886–20893.
8. Kyriakis J.M., Avruch J. // J. Biol. Chem. 1996. V. 271. P. 24313–24316.
9. Papermaster D.S., Dreyer W.J. // Biochemistry. 1974. V. 13. P. 2438–2444.
10. Braun S., Raymond W.E., Racker E. // J. Biol. Chem. 1984. V. 269. P. 2051–2054.
11. Bradford M.M. // Anal. Biochem. 1976. V. 72. P. 248–254.

Light Inhibits Tyrosine Kinase Activity in Retinal Rod Outer Segments *in vitro*

A. M. Sholukh**, I. D. Artamonov**, L. A. Baranova*, V. M. Lipkin**, and I. D. Volotovskii*

Phone: +375 (17) 284-2252, fax: +375 (17) 284-2359, e-mail: sholukh@bas07.bas-net.by

*Institute of Photobiology, National Academy of Sciences of Belarus, ul. Akademicheskaya 27, Minsk, 220072 Belarus;

**Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP Moscow, 117997 Russia

It was shown that short-term (10 min) light exposure of dark-adapted retinal rod outer segments (ROS) leads to a threefold inhibition of the tyrosine kinase activity. Tyrosine kinase activity in the ROS from bleached retinas is by 30% lower than in the dark-adapted ROS. Prolonged illumination (60 min) of the dark-adapted ROS restores the tyrosine kinase activity to the level of ROS from the bleached retinas. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2001, vol. 27, no. 6; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: photoregulation, protein tyrosine kinase, retinal rod outer segments