

ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ БЕЛКОВ ПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ Ca-дсРНК КАК ФАКТОР, ПОДАВЛЯЮЩИЙ АДСОРБЦИЮ ВИРУСА

Р. А. ЗАХАРЯН, К. А. БАКУНЦ, М. Г. ГЕВОРКЯН

Институт экспериментальной биологии АН АрмССР, Ереван

Установлена прямая зависимость процесса подавления адсорбции вируса ВЭМК на L-клетках от степени фосфорилирования белков плазматической мембраны.

Հաստատվում է ուղղակի կապ ՎՋՄ վիրուսի կոչման L. բջիջների վրա արտաբջջային ԱճՄՆ պրոցեզի և պլազմատիկ Բազմերների փոփոխությունների ֆոսֆորիլացման աստիճանի միջև:

A straight dependence is established between the levels of plasmatic membrane proteins phosphorylation and inhibition of the virus adsorption on L-cells.

дсРНК — мембранные белки — фосфорилирование.

Двухспиральные РНК известны как индукторы интерферона, стимуляторы первичного и вторичного иммунного ответа, модуляторы ряда биохимических реакций. Ранее нами на нейронах [3], тромбоцитах кошки и человека [6] было показано, что РНК, ДНК и в особенности дсРНК являются активаторами мембранных функций клетки; в основе их действия лежат процессы, связанные с повышением в клетке уровня цАМФ, активацией трансмембранных токов экстрацеллюлярного Ca^{2+} , активацией фосфолипазы A_2 [12], более выраженных при использовании ДНК, РНК, дсРНК в форме Са-преципитата. ДсРНК существенно повышает степень фосфорилирования белков плазматической мембраны клеток, полученный спектр мол. масс фосфорилированных белков в целом близок к таковому белков мембранной фракции по цАМФ-зависимому фосфорилированию [4, 7]; взаимодействие дсРНК с плазматической мембраной клетки высокоспецифично, факторы связывания на поверхности клеток представлены протенинами, по своим характеристикам взаимодействие дсРНК — мембрана аналогично лиганд-рецептор взаимодействию [5]. Одним из ранних эффектов взаимодействия дсРНК с мембраной является активация фосфолипазы A_2 с накоплением в мембране, клетке ненасыщенных жирных кислот и лизоформ фосфолипидов, обладающих выраженными иммуномодулирующими свойствами. Одновременно накопление ненасыщенных жирных кислот и лизоформ фосфолипидов, обладающих детергентными мембранолизитическими свойствами, повышает подвижность в мембранном фосфолипидном слое, способствует кластеризации внутримембранных белков, локальным перестройкам липидного матрикса мембраны в микроокружении рецеп

Сокращения: дсРНК — двухспиральная РНК

торов, нарушению их функции. По нашим данным, такие перестройки в микроокружении рецептора вируса энцефаломиокардита мышей, осповакцины, вызываемые дсРНК, могут, по-видимому, ингибировать сорбцию вируса на клетке на 75—90% [4, 5].

В данном исследовании представлены результаты изучения вклада фосфорилирования белков плазматической мембраны клеток L-929 в ингибирование процесса сорбции вируса ВЭМК.

Материал и методика. ДсРНК выделяли из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Тотальную фракцию РНК осаждали спиртом, растворяли в $2 \times 10^{-2} \text{ M NaCl}$ и обрабатывали РНКазой (50 мкг/мл). Двухспиральную РНК выделяли на колонке с неиммобилизованной целлюлозой элюируя буфером TES (0,01 M NaCl, 0,001 M EDTA, 0,05 M трисHCl, pH 6,9) с 15% этанол. Фракцию, содержащую дсРНК, осаждали спиртом.

Фракционирование мозга крыс проводили гомогенизацией тотальной мозговой ткани в 5-кратном объеме 10 mM трисHCl буфера (pH 7,5), содержащего 0,32 M сахарозу и 1 mM MgCl_2 . Очистку и выделение нейрональных плазматических мембран проводили по методу, описанному ранее [9]. При выделении цитозольной фракции гомогенизацию проводили в буфере, не содержащем сахарозу, и центрифугировали при $100\,000 \times g$ в течение 30 минут. Концентрацию белка во фракциях определяли по Лоури [11] и спектрофотометрированием [2].

Фосфорилирование белков мозга проводили следующим образом. Инкубационная смесь содержала 50 mM трисHCl (pH 7,5), 10—25 mM MgCl_2 , 5 mM $[\text{32P}] \text{ATP}$ (0,1 мкКи/моль), 100 мкг белка и углевода в различных концентрациях дсРНК и без нее.

Через определенные промежутки времени реакцию останавливали добавлением 50%-ной ТХУ до конечной концентрации 5% и реакционную смесь наносили на мембранные фильтры с дальнейшей 3-кратной отмывкой 5%-ной ТХУ.

При получении меченого $[\text{3H}]$ -уридином вируса ВЭМК использовали 2-часовую одностойную культуру независимой линии клеток L-929, которую заражали вирусом ВЭМК в разведении 10^{-2} . Адсорбцию проводили при 37° в течение 1 часа. После адсорбции монослой промывали средой 199 и клетки инкубировали в той же среде с добавлением 10%-ной сыворотки и $[\text{3H}]$ -уридина в концентрации 100 мкКи/мл в течение 24 часов. Культуральную вирусосодержащую среду осветляли при $10\,000 \times g$ в течение 90 мин при 4° . Вирус осаждали центрифугированием при $30\,000 \text{ об/мин}$ в течение 2 часов. Осадок ресуспендировали в буфере TES (0,01 M трисHCl, pH 7,4; 0,1 M NaCl, 0,001 M EDTA), наносили на 20%-ную сахарозу и центрифугировали при $36\,000 \text{ об/мин}$ в течение 1,5 час. Осадок вируса суспендировали в среде 199.

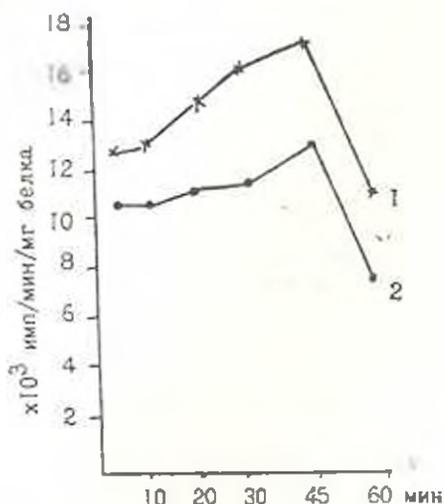
Активность аденилатциклазы определяли по методу [12], активность фосфолипазы cAMP —по методу [1].

Активацию аденилатциклазы в клетках L-929 индуцировали обработкой клеток фторсколином.

Результаты и обсуждение. При исследовании возможного влияния дсРНК на процесс фосфорилирования в изолированной мембранной фракции мозга крыс получена кинетика процесса, представленная на рисунке. Как видно, в присутствии дсРНК наблюдается значительное фосфорилирование белков мембранной фракции, уровень которого, однако, после определенного времени прекращает увеличиваться и даже несколько снижается. Поскольку этот эффект имеет место как в присутствии дсРНК, так и в среде без нее, можно предположить, что снижение уровня фосфорилирования связано в первую очередь с действием протенифосфатаз.

Данные о фосфорилировании в различных клеточных фракциях представлены в табл. 1, из которой также следует, что стимуляция

дсРНК-протеникиназной активности относительно более выражена (55%) в мембранной фракции. Как известно [10], цАМФ-зависимые протеникиназы в мозге быка и крысы примерно поровну распределяются между цитозолем и тотальной фракцией, содержащей мембрану и органеллы клетки.



Кинетика эндогенного фосфорилирования мембранной фракции мозга крысы в присутствии дсРНК (1) и в среде без нее (2).

Таблица 1. Фосфорилирование клеточных фракций мозга крысы

Фракция	Фосфорилирование, мк моль ³² P/мин на 1 мг белка		Степень активации	Процент активации
	— дсРНК	+ дсРНК		
Цитозоль	2,72	7,4	2,7	25
Мембраны	7,52	12,79	1,6	55
Ядра	4,61	5,16	1,12	20

Сходство спектров молекулярных масс фосфорилированных белков при дсРНК-зависимом и цАМФ-зависимом фосфорилировании дает основание полагать, что дсРНК индуцирует процессы, приводящие к повышению уровня цАМФ и, таким образом, включает аденилатциклазную систему, активирует протеникиназу цАМФ, обеспечивая регуляцию фосфорилирования белков плазматической мембраны нервных клеток.

Представлялось существенным выяснить механизмы увеличения содержания цАМФ в клетках мозга крыс. Как видно из данных табл. 2, активность аденилатциклазы в присутствии дсРНК существенно не изменялась.

Можно было предположить, что ингибируется система гидролиза цАМФ. Проведенные эксперименты показали, что дсРНК ингибирует фосфодиэстеразу цАМФ, причем действует на КМ-зависимую активацию, но не на базальную активность. Таким образом, ингибирование КМ-зависимой активации фосфодиэстеразы цАМФ обеспечивает, по-

Таблица 2. Влияние дсРНК на активность аденилатциклазы и фосфоэстеразы глических нуклеотидов

	Активность аденилатциклазы, нмп/мин/100 мкг белка		Активность фосфоэстеразы, активируемой КМ	
			нмп/мин на 100 мкг белка	% ингибирования
Контроль	3485	100	6582	100
дсРНК	3116	90	2202	67
			3225	49

Каждое измерение—среднее 5 экспериментов.

видимому, повышение уровня цАМФ в клетках, которое обеспечивает активацию цАМФ-зависимых протеинкиназ. В пользу данного заключения свидетельствует коллоидный нами при действии дсРНК спектромолекулярных масс фосфорилируемых белков плазматической мембраны, в целом близкий молекулярным массам белков, фосфорилируемых системой цАМФ-зависимой протеинкиназы в плазматических мембранах клеток мозга быка и свиньи.

Ранее было показано, что фосфорилирование мембраны приводит к подавлению сродства хеморецепторов к синантрическим медиаторам, имеющим пептидную природу [8]. По аналогии с взаимодействием рецепторов-лиганд предполагалось, что взаимодействие вирус-мембрана также будет находиться в зависимости от степени фосфорилирования белков плазматической мембраны.

Таблица 3. Влияние дсРНК на адсорбцию вируса ВЭМК на клетках L-929

Степень адсорбции	дсРНК (в % от контроля) нуклеотидов: моно-, ди-, тетра- нуклеотидов	дсРНК (в % от контроля) гидролизованная до моно-, ди-, тетра- нуклеотидов
Контроль	18361	18360
1 мин	4993	12481
15 мин	10318	8053
30 мин	10432	10729
1 ч	15018	11508
3 ч	10916	9140

Клетки предобработывались дсРНК в течение 0, 1, 15, 30 мин и в 2 ч, далее производилась адсорбция вируса в течение 1 часа. Каждое определение—среднее 3 измерений.

Как видно из данных табл 3, дсРНК (в процентах от контроля) существенно снижает (на 74—45%) адсорбцию вируса ВЭМК на плазматической мембране клеток L-929. Используемая в тех же концентрациях дсРНК, гидролизованная до моно-, ди-, тетра-нуклеотидов, практически не проявляет эффекта.

Если относительно «поздний» эффект (3ч) подавления адсорбции вируса на 30—45% может быть объяснен в конечном итоге индукцией интерферона, то «ранние» эффекты дсРНК—подавление адсорбции ви-

руса на плазматической мембране (1 мин—1 ч) — могут свидетельствовать, по-видимому, о наличии другого механизма, действующего в условиях отсутствия интерферона, на уровне межмолекулярных взаимодействий внутри плазматической мембраны.

С целью установления прямой зависимости процесса подавления адсорбции вируса на клетке от степени фосфорилирования белков плазматической мембраны мы изучали процесс сорбции вируса ВЭМК на плазматической мембране клеток L-929, предварительно обработанных форсколином, активатором фермента аденилатциклазы.

Таблица 4. Сорбция вируса ВЭМК на фибробластах мыши в присутствии форсколина и дсРНК

Препарат	Время воздействия дсРНК или форсколина				
	1 мин	15 мин	30 мин	1 ч	3 ч
	% от контроля				
Контроль	100	100	100	100	100
Форсколин	60	60	65	65	70
дсРНК	40	40	40	40	45

Полученные результаты (табл. 4) свидетельствуют, что активация аденилатциклазы, повышение в клетке уровня цАМФ и, как следствие, увеличение уровня фосфорилирования плазматических мембран вызывают подавление адсорбции вируса ВЭМК на поверхности клеток L-929.

Таким образом, можно сделать вывод об определенном вкладе процесса фосфорилирования белков плазматической мембраны в десенситизацию клеточной поверхности к адсорбции вируса.

Авторы благодарят д. б. н. С. Н. Айрапетяна за участие в обсуждении полученных данных о роли фосфорилирования в десенситизации сродства плазматических мембран к сорбции вирусом.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бобрускин И. Д., Шайкин С. М., Муратова М. В., Баранови Л. А., Северин Е. С. Биохимия, 52, 8, 1344—1352, 1987.
2. Дэвис Р., Ботстај Д., Ром Д. Генетика бактерий, 153, М, 1984.
3. Захарян Р. А., Рычков Г. Е., Дадалян С. С., Бакунц И. С., Агабалян А. С., Рухлян Л. А., Айрапетян С. Н. Нейрохимия, 5, 3, 239—247, 1986.
4. Захарян Р. А., Бакунц К. А., Скобелева Н. А. Нейрохимия, 8, 1, 34—38, 1989.
5. Захарян Р. А., Бакунц К. А., Геворкян М. Г. Докл. АН АрмССР, 86, 4, 174—177, 1988.
6. Канцян М. Г., Амроян Э. А., Захарян Р. А., Агабалян А. С., Чарчоглян А. А., Акопян Ж. И., Габриелян Э. С. Докл. АН АрмССР, 79, 3, 140—144, 1984.
7. Кочетков С. М., Абдурагимов А. Р., Лукашина Т. Н., Северин Е. С. Биохимия, 49, 2, 344—348, 1984.
8. Auzaretian S. N., Arvanov V. L., Maginian S. B., Azatjan K. V. Cellular and Molecular Neurobiology, 5, 3, 235—243, 1983.
9. Helli F. A. Adv. in Cell Neurobiol., 1, 379—403, 1981.

10. Lohmann B. M., Walter U., Greengard P. J. Biol. Chem., 255, 20, 9985—9992, 1980.
11. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. Z., Randall R. J. J. Biol. Chem., 193, 265—275, 1951.
12. Steiner A. Z., Pagliara A. S., Chase J. R. J. Biol. Chem., 247, 1114—1120, 1972.
13. Zakharian R. A., Karageuzyan K. G., Ovaktimian S. S., Vardanyan M. K., Gasparian N. T. ISF—JPCS World Congress, Sept. 26—30, Tokio, 3P12, 1988.

Поступило 9.VIII 1989 г.

Бюлог. журн. Армении. № 6 (43), 1990

УДК 577.352.315:612.111.612.014.462.4

МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ ИНДУЦИРОВАННОЙ ОКИСЛЯЮЩИМИ АГЕНТАМИ Ca^{2+} -ЗАВИСИМОЙ КАЛИЕВОЙ ПРОВОДИМОСТИ ЭРИТРОЦИТОВ

А. В. ГЮЛЬХАНДЖЯН, Г. М. ГЕОКЧАКЯН

Ереванский филиал Всесоюзного научного центра хирургии АМН СССР

Показано усиление под влиянием Ca^{2+} калиевой проводимости эритроцитов человека, индуцированной окисляющими агентами: электрондонорной системой аскорбат + ФМС и периодатом Na. Научены эффекты ингибиторов энергетических процессов, антиоксидантов, некоторых фенольных соединений и SH-реагентов на Ca^{2+} -зависимый выход K^+ . В отличие от действия периодата, образующего поры в мембранах, Ca^{2+} -зависимый калиевый канал, активируемый аскорбатом + ФМС, функционально связан с окислительно-восстановительными компонентами мембран. Сделан вывод о существовании различных механизмов регуляции выхода K^+ из клеток.

Տալոց է արված, որ մարդկային էրիտրոցիտներում Ca^{2+} ազդեցությամբ ակտիվանում է կալիումի ճաղորդականությունը, առաջացված «բարիտացող նյութերով» (էներգետիկ ղեկավարողին սխառեմով սակարրատ ֆենոլայիններուց՝ ֆուլ (ՖՄՍ)) և Na պերիոդատով:

Ուսումնասիրված է էներգետիկ ինհիբիտորների, անտիօքսիդանտների, որոշ ֆենոլային միացումների և SH-ոնազնետների էֆեկտները Ca^{2+} կախված K^+ էլիքի վրա: Ի տարբերություն պերիոդատի ազդեցության, որը առաջ է առաջացնում կենսաթաղանթներում, Ca^{2+} -կախված կալիումի կանալը, ակտիվացված սակարրատ + ՖՄՍ-ով, ֆունկցիոնալ կապված է կենսաթաղանթների օքսիդացման կոմպոնենտների հետ: Ոնթացվում է, որ ղեկավարում ունեն ընդունելից K^+ էլիքի տարրեր կարգավորման մեխանիզմներ:

The increase by Ca^{2+} of potassium conductivity of human erythrocytes, induced by oxidating agents, electron donor system ascorbate + phenazine (PMS) and periodate Na was shown. The effects of inhibitors of energetic processes, antioxidants, some phenol compounds and SH-reagents on Ca^{2+} -dependent K^+ efflux were investigated. In contrast to the periodate, forming pores in membranes, Ca^{2+} -dependent K^+ channel activated by ascorbate + PMS is functionally connected with membrane redox components. We concluded, that different regulatory mechanisms of K^+ efflux from cells exist.

Сокращения: ФМС—феназинметосульфат, ПОЛ—перекисное окисление липидов, ГБК—тиобарбитуровая кислота, МДА—малоновый диальдегид, ДЦКД—N,N'-дициклогексилкарбодимид, ДХФИФ—дихлорфенолиндофенол, ПХМБ—парахлормеркуробензоат, SITS—4-ацетамидо-4'-изотиазианостильбен-2,2'-дисульфоновая кислота, НАДН—никотинамидадениндинуклеотид восстановленный.