

З'ясування ролі тирозинкінази Syk під час нейрональної диференціації клітин ембріональної карциноми миші P19, індукованої ретиноєвою кислотою

В. М. Кухарський^{1, 2}, Е. Драберова², Я. Б. Блюм^{1, 3}, П. Драбер²

¹ Київський національний університет імені Тараса Шевченка
Вул. Володимирська, 64, Київ, 01033, Україна

² Інститут молекулярної генетики Чеської академії наук
Вул. Віденська, 1083, Прага, 4, Чеська Республіка

³ Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України
Вул. Академіка Заболотного, 148, Київ, 03143, Україна

Показано зміни рівнів експресії тирозинкінази Syk під час нейрональної диференціації, яку змодельовано на культурі клітин ембріональної карциноми мишей, стимульованої ретиноєвою кислотою. Вивчаючи розподіл тирозинкінази Syk у розчинній та збагаченій елементами цитоскелета нерозчинній фракціях клітин, вперше виявлено внутрішньоклітинний перерозподіл тирозинкінази Syk під час нейрональної диференціації. Висловлено припущення про можливий зв'язок цього білка з елементами цитоскелета.

Вступ. Білки родини Syk тирозинкіназ, до якої належать тирозинкінази Syk та Zap-70, характеризуються наявністю двох гомологічних доменів Src2 (SH2) та відсутністю ділянки для прикріплення до мембрани. Зростаюча кількість інформації відносно цієї родини тирозинкіназ свідчить про те, що тирозинкіназа Syk є необхідною для розвитку та функціонування деяких гематопоетичних клітин. Тирозинкінази родини Syk активуються шляхом взаємодії ділянки SH2 з імунорецепторною основною тирозиною активаційною ланкою (ITAM) у рецепторі імунної відповіді. Важливу роль цієї тирозинкінази в передачі сигналу з імунорецепторів було виявлено і в подальшому вивчено при використанні мишей з дефіцитом тирозинкінази Syk [1]. Разом з тим починають з'являтися докази на користь існування численних функцій тирозинкінази Syk у різних шляхах внутрішньоклітинної сигналізації [2].

Для гематопоетичних клітин показано активацію тирозинкінази Syk через інтегрини, які не містять компонента ITAM, що свідчить про важливу роль інтегринів для функціонування цієї кінази [3]. Нещодавно знайдено, що для білка Syk характерним є широкий діапазон експресії в негематопоетичних клітинах, включаючи епітеліальні клітини, гепатоцити, фібробласти, ендотеліальні клітини судин [4, 5], що вказує на загальнофізіологічну функцію цієї кінази. Зовсім недавно виявлено експресію тирозинкінази Syk у клітинах нейронального походження [6]. Автори зафіксували експресію цього білка в нейроноподібних клітинах і довели, що тирозинкіназа Syk бере участь у сигнальних ланках активації кінази, яка регулюється сигналом, що надходить ззовні (ERK), при нейроноподібній диференціації клітин P19. Виявилось, що під час нейрональної диференціації тирозинкіназа Syk достовірно фосфорилується по залишках тирозину. Подібні результати свідчать про те, що білок Syk може відігравати важливу роль процесі нейрональної диференціації.

У зв'язку з цим в даній роботі ми ставили завдання порівняти за допомогою кількісного аналізу експресію кінази Syk під час нейронально-подібної диференціації в культурі клітин ембріональної тератокарциноми мишей P19, ініційованої ретиноевою кислотою, для встановлення можливих шляхів внутрішньоклітинної сигналізації під час цього процесу.

Матеріали і методи. Клітини P19.X1 субклону мишачих клітин ембріональної карциноми [7] культивували в базовому культуральному середовищі, яке містило модифіковане середовища Дюльбеко і RPMI 1640 у співвідношенні 1:1 та 10 %-ву суміш ембріональної бичачої сироватки, пеніциліну (100 од/мл) і стрептоміцину (0,1 мг/мл). Культуру клітин культивували при температурі 37 °C у повітряній атмосфері з додаванням 5 %-го CO₂ та висівали кожні два дні з використанням 0,02 %-го ЕДТА в розчині 0,15 М NaCl/0,01 М фосфату, рН 7,5. Агрегати клітин формували при нарощуванні клітинної маси до 10⁵/мл клітин у мікробіологічних чашках Петрі. Після двох днів агрегати клітин м'яко осаджували і ресуспендували в культуральному середовищі з вмістом 10⁻⁶ М ретиноевої кислоти та переносили в чашки для культури клітин у кількості 10⁵ клітин на чашку. Культуральне середовище з ретиноевою кислотою замінювали кожні два дні.

Імунофлуоресцентну та диференційно контрастну мікроскопію проводили на фіксованих клітинах, як описано раніше [8]. Клітини швидко промивали стабілізуючим мікротрубочки (MSB) буфером (20 мМ MES, 2 мМ EGTA, 2 мМ MgCl₂, рН 6,9), екстрагували протягом 1 хв у 0,02 %-му тритоні X-100 і фіксували упродовж 20 хв в 3 %-му формальдегіді в MSB буфері. Підготовлені таким чином клітини промивали тричі в MSB буфері та інкубували протягом 45 хв при кімнатній температурі з антитілами TU-01 проти α -тубуліну в концентрації 5 мкг/мл. Після промивання клітини інкубували з вторинними антитілами, кон'югованими з флюорохромом у розведенні 1:100. Препарати занурювали в смолу MOWIOL 4-88 («Calbiochem AG», Швейцарія) та вивчали за допомогою мікроскопу Olympus A70 Provis, обладнаного 60 \times і 20 \times водно-імерсійними об'єктивами. Зображення знімали за допомогою цифрової камери Life Science Resources KAF 1400 з охолоджуваною матрицею. Для контролю використано антитіла HTF-14, причому не зафіксовано жодних сигналів.

Приготування екстракту клітин. Для приготування тотального екстракту культуру клітин на 90-мм чашках Петрі тричі швидко промивали в фосфатному буфері (0,1 М фосфат натрію, 0,14 М

NaCl, 2,6 мМ KCl, рН 7,5) (PBS) при 4 °C та екстрагували в лізуючому буфері [9] у кількості 1 мл на чашку, після чого екстракт витримували 5 хв при температурі 95 °C. Для приготування розчинної та збагаченої стабільними елементами цитоскелета фракцій екстракту клітин культуру клітин промивали тричі в PBS буфері (4 °C) та екстрагували за допомогою MSB буфера з додаванням суміші інгібіторів протеаз «Complete, mini» відповідно до рекомендацій фірми «Roche» (Німеччина) та 1 %-го нонідету-40. Клітини переносили в пластиковий контейнер і продовжували екстракцію протягом 10 хв за допомогою ротатора при 4 °C, після чого центрифугували при 40000 g упродовж 15 хв (4 °C). Отриману розчинну фракцію відбирали, а нерозчинну — збагачену стабільними елементами цитоскелета, розчиняли в лізуючому буфері [9]. Всі екстракти використовували свіжими або зберігали при -70 °C. В них визначали концентрацію білків: для екстрактів з вмістом гліцерину — за допомогою методу срібної плями [10], для інших екстрактів — з використанням біцинхонінікової кислоти [11].

ПААГ електрофорез та імуноблотинг. Поліакриламідний гель-електрофорез у присутності додецилсульфату натрію проводили відповідно до [9]. В кожну лунку завантажували екстракт із розрахунку 10 мкг загального білка. Розділені білки переносили з гелю на нітроцелюлозні мембрани відповідно до [12]. Далі мембрани промивали трис-HCl (TBST) буфером (10 мМ трис-HCl, 150 мМ NaCl, 0,05 % твін-20, рН 7,4) та блокували 3 %-м розчином БСА протягом 1 год, після чого інкубували з розчином первинних антитіл у буфері TBST упродовж 1 год у таких концентраціях: TU-01 — 1:1000; N-19 — 1:500; TUB-2.1 — 1:2000; TUB1 — 1:3000; 6-11B-1 — 1:2000. Після інкубації мембрани промивали тричі (5 хв) у TBST буфері та інкубували 1 год у розчині вторинних антитіл, кон'югованих з пероксидазою хрому і розведених 1:10000 у 1 %-му розчині знежиреного сухого молока в буфері TBST. Мембрани промивали 5 разів по 5 хв у буфері TBST та обробляли за допомогою набору вдосконаленої хемілюмінесценції відповідно до рекомендацій фірми «Pierce». Хемілюмінесцентне свічення фіксували на фотопластинках фірми «Kodak» (США) з використання різних експозицій. Результати не менше трьох різних експериментів було піддано оптико-денситометричному та статистичному аналізу за допомогою методу Ст'юдента.

Ультрацентрифугування у градієнті концентрації сахарози. Для вивчення розподілу за молекулярною масою розчинних комплексів, які містять

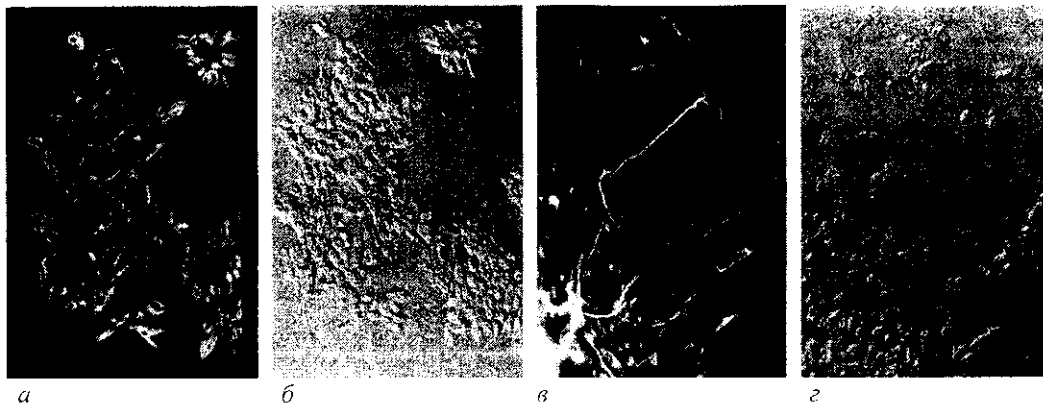


Рис. 1. Імунофлуоресцентна мікроскопія неактивованих (а, б) та активованих ретиноевою кислотою протягом 6 днів (в, г) клітин P19 з використанням антитіл проти α -тубуліну. У випадках б і г використано диференційну контрастну мікроскопію

білок Syk, під час нейрональної диференціації протягом 12 днів після індукції ретиноевою кислотою підготували градієнтний розчин сахарози зі спадаючою концентрацією знизу вгору від 40 до 5 % у буфері, що містив 50 мМ HEPES, 1 мМ $MgCl_2$, 1 мМ EGTA, 1 мМ β -меркаптоетанол, 75 мМ KCl та інгібітори протеаз. Розчинний екстракт клітин нашаровували на сахарозну подушку в кількості 75 мкл. Ультрацентрифугування проводили на ультрацентрифузі «Beckman L-70» з ротором SW55, прискоренням 236880 g при температурі 4 °C протягом 5,5 год. Після ультрацентрифугування відібрали 14 фракцій, починаючи зверху. Білки з кожної фракції осаджували за допомогою 10 %-го розчину трихлороцтової кислоти, розчиняли в лізуючому буфері [9] та використовували для імуноблотингу.

Поліклональні антитіла (N-19) проти білка Syk надійшли від «Santa Cruz Biotechnology» (США). Моноклональні антитіла TUB-2.1 проти β -тубуліну отримано від «Sigma-Aldrich» (США). Нейрон-специфічні антитіла TUJ1 проти β III-тубуліну одержано від «Wako» (США). Антитіла TU-01 проти α -тубуліну були люб'язно надані авторами [13]. Антитіла до ацетилюваного α -тубуліну 6-11B-1 були від «Sigma-Aldrich». Моноклональні антитіла HTF-14 проти людського трансферину отримано згідно з [14]. Анти-кролячі антитіла, кон'юговані з ізотіоціанатфлуоресцеїном були від Jackson ImmunoResearch Laboratories (США). Анти-мишачі та анти-кролячі IgG антитіла, кон'юговані з пероксидазою хрому, замовлено в «Promega Biotec» (США). Ретиноеву кислоту замовлено в «Sigma-Aldrich». Набір для вдосконаленої хемілюмінесценції «Super Signal» отримано від «Pierce». Коктейль інгібіторів протеаз «Complete, mini» замовили у «Roche».

Результати і обговорення. Результати імунофлуоресцентної мікроскопії з використанням антитіл проти α -тубуліну свідчать, що внаслідок інкубації клітин з ретиноевою кислотою на шостий

день з'являються характерні для нейронів проєкції клітин та відростки. Порівняння неіндукованих та індукованих ретиноевою кислотою клітин протягом шести днів показано на рис. 1.

При аналізі результатів імуноблоту тотального екстракту клітин спостерігали складну картину зміни експресії Syk (рис. 2, А) протягом 12 днів після індукції диференціації. Одночасно для контролю за процесом нейрональної диференціації контролювали рівень експресії β III-тубуліну, який є нейронспецифічним. Ця ізоформа тубуліну з'являлася на 6-й день дії ретиноевої кислоти. Оскільки раніше було показано, що в процесі нейрональної диференціації значно зростає рівень ацетилювання α -тубуліну (що, зокрема, призводить до появи стабільних мікротрубочок) [15], то оцінку рівня цієї модифікації тубуліну також було використано для контролю за процесом диференціації.

Рівень експресії тирозинкінази Syk зростав на кінцевих етапах нейрональної диференціації приблизно на 20 % у порівнянні з неіндукованими ретиноевою кислотою клітинами. Експресію Syk спостерігали на всіх стадіях нейрональної диференціації, що відповідає раніше отриманим результатам [6], але ми виявили значне (до 60 %) зниження рівня експресії на початкових стадіях диференціації, яке досягало максимуму на третій день після початку дії ретиноевої кислоти. Подібний ефект спостерігався вперше і не був раніше описаний в літературі. Зрозуміло, що тирозинкіназа Syk бере участь у процесі нейрональної диференціації, але шляхи передачі сигналу при цьому залишаються нез'ясованими. Добре відомо, що значну роль у функціонуванні і диференціації нервової тканини відіграє цитоскелет, особливо система мікротрубочок [16]. Також встановлено, що тирозинкіназа Syk може брати участь у передачі сигналу до мікротрубочок [17]. З цього випливає, що, можливо, тирозинкіназа Syk причетна до сигналізації під час нейрональної диференціації через

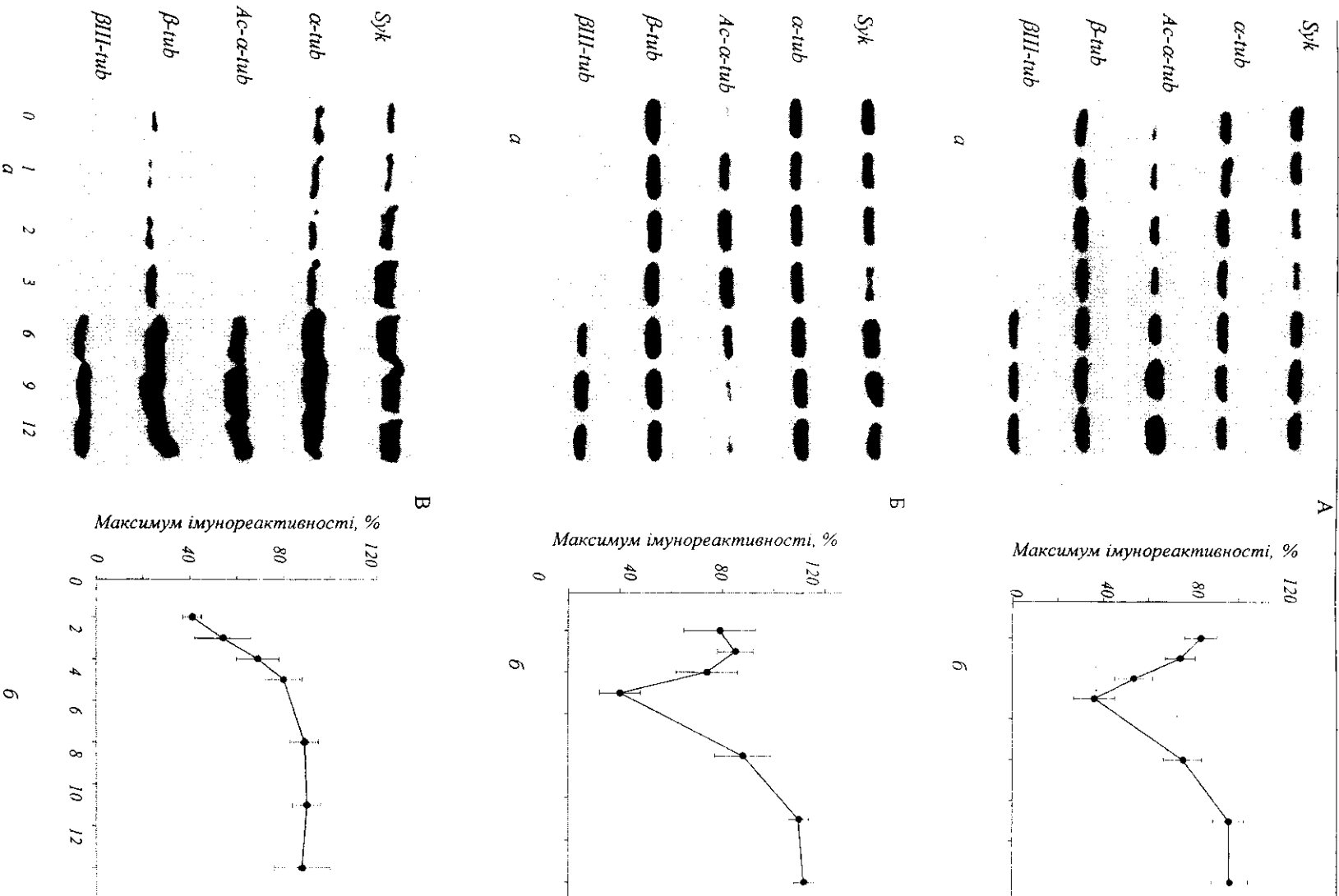


Рис. 2. Результати імуноблоту тотального екстракту (А), екстракту розчинних елементів (Б) та екстракту нерозчинних збагачених елементами цитоскелета (В) клітин P19 при дії ретиноєвої кислоти (а) та оптико-денситометричний аналіз оптичної густини хемільюмінесцентного свічення при використанні антитіл проти білка Сyk (б)

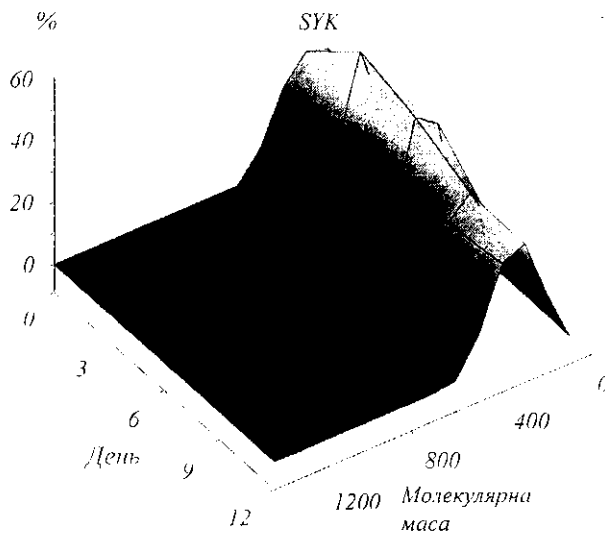


Рис. 3. Розподіл розчинних комплексів білків, що містять тирозинкіназу Syk, за молекулярною масою (згідно з даними ультрацентрифугування в градієнті концентрації сахарози) під час нейрональної диференціації

посередництво системи мікротрубочок. Для перевірки цієї гіпотези нами проаналізовано рівень експресії кінази Syk у розчинній та нерозчинній (збагаченій стабільними елементами цитоскелета) фракціях клітин P19 під час нейрональноподібної диференціації (рис. 2, Б, В).

Добре помітним було зростання відносного рівня тирозинкінази Syk у нерозчинній фракції на пізніших стадіях диференціації і особливо на третій день, коли значно знижується її загальний рівень і фермент майже повністю переходить у нерозчинну фракцію. Третій день нейрональноподібної диференціації, схоже, є ключовим днем, хоча клітина ще не набула особливостей, характерних для нервових клітин. Очевидно, саме в цей час відбувається перемикання сигнальних ланок на шлях нейрональної диференціації.

За результатами ультрацентрифугування розчинних елементів клітин у градієнті канцентрації сахарози (рис. 3) можна бачити, що розчинні комплекси білків, які містять тирозинкіназу Syk, мають молекулярну масу в діапазоні від 100 до 300 кДа. Така величина комплексів свідчить про наявність невеликих за розміром функціональних агрегатів молекул, до складу яких може входити 2—4 білки. Проте слід зауважити, що екстракція та ультрацентрифугування відбуваються у відносно жорстких умовах, за яких руйнуються малостабільні комплекси, тобто теоретично ймовірним є

існування більших за масою функціональних комплексів. У процесі нейрональної диференціації ми спостерігали певний зсув маси комплексів у бік зростання, що може свідчити про ускладнення сигнальних шляхів, у яких бере участь тирозинкіназа Syk.

Висновки. Таким чином, результати проведеного дослідження виявили складну зміну експресії тирозинкінази Syk під час нейронального диференціювання, індукованого ретиноевою кислотою. Вперше показано зміну рівня тирозинкінази Syk у розчинних та збагачених елементами цитоскелета нерозчинних компонентах клітини під час нейрональної диференціації. Виявлені факти наводять на думку про зв'язок цього білка з елементами цитоскелета на ранніх стадіях диференціації нейронів. Вивчення конкретних шляхів передачі сигналу при цьому становить тему майбутніх досліджень.

V. M. Kukharsky, E. Draberova, Ya. B. Blume, P. Draber

A role of tyrosine kinase Syk during neuronal differentiation of murine embryonal carcinoma cells P19, stimulated by retinoic acid

Summary

Using a culture of murine embryonal carcinoma cells stimulated by retinoic acid as a model of neuronal differentiation the changes in the tyrosine kinase Syk expression during neuronal differentiation have been shown. Study on the Syk tyrosine kinase distribution in both soluble and insoluble, enriched by elements of cytoskeleton, fractions of cells, has revealed first the endocellular redistribution of tyrosine kinase Syk during neuronal differentiation. A possible interaction of tyrosine kinase Syk with cytoskeleton elements is assumed.

В. М. Кухарский, Э. Драберова, Я. Б. Блюм, П. Драбер

Выяснение роли тирозинкиназы Syk во время нейрональной дифференциации клеток эмбриональной карциномы мыши P19, индуцированной ретиноевой кислотой

Резюме

Показано изменение экспрессии тирозинкиназы Syk во время нейрональной дифференциации, смоделированной на культуре клеток эмбриональной карциномы мышей, стимулированной ретиноевой кислотой. Изучая распределение тирозинкиназы Syk в растворимой и обогащенной элементами цитоскелета нерастворимой фракциях клеток впервые выявлено внутриклеточное перераспределение тирозинкиназы Syk во время нейрональной дифференциации. Высказано предположение о возможной связи этого белка с элементами цитоскелета.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Yanagi S., Inatome R., Ding J., Kitaguchi H., Tybulewicz V. L., Yamamura H. Syk expression in endothelial cells and their morphologic defects in embryonic Syk-deficient mice // *Blood*.—2001.—98, N 9.—P. 2869—2871.
2. Yanagi S., Inatome R., Takano T., Yamamura H. Syk expression and novel function in a wide variety of tissues // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*—2001.—288, N 3.—P. 495—498.
3. Obergfell A., Eto K., Mocsai A., Buensuceso C., Moores S. L.,

- Brugge J. S., Lowell C. A., Shattil S. J.* Coordinate interactions of Csk, Src, and Syk kinases with $[\alpha]_{IIb}[\beta]_3$ initiate integrin signaling to the cytoskeleton // *J. Cell Biol.*—2002.—157, N 2.—P. 265—275.
4. *Inatome R., Yanagi S., Takano T., Yamamura H.* A critical role for Syk in endothelial cell proliferation and migration // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*—2001.—286, N 1.—P. 195—199.
 5. *Sada K., Takano T., Yanagi S., Yamamura H.* Structure and function of Syk protein-tyrosine kinase // *J. Biochem. (Tokyo)*—2001.—130, N 2.—P. 177—186.
 6. *Tsujimura T., Yanagi S., Inatome R., Takano T., Ishihara I., Mitsui N., Takahashi S., Yamamura H.* Syk protein-tyrosine kinase is involved in neuron-like differentiation of embryonal carcinoma P19 cells // *FEBS Lett.*—2001.—489, N 2—3.—P. 129—133.
 7. *Draber P., Maly P.* Mutants of embryonal carcinoma cells defective in the expression of embryoglycan // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1987.—84, N 16.—P. 5798—5802.
 8. *Draberova E., Draber P.* A microtubule-interacting protein involved in coalignment of vimentin intermediate filaments with microtubules // *J. Cell Sci.*—1993.—106, N 4.—P. 1263—1273.
 9. *Luennli U. K.* Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature.*—1970.—227, N 259.—P. 680—685.
 10. *Draber P.* Quantification of proteins in sample buffer for sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis using colloidal silver // *Electrophoresis.*—1991.—12, N 6.—P. 453—456.
 11. *Smith P. K., Krohn R. I., Hermanson G. T., Mallia A. K., Gartner F. H., Provenzano M. D., Fujimoto E. K., Goeke N. M., Olson B. J., Klenk D. C.* Measurement of protein using bicinchoninic acid // *Anal. Biochem.*—1985.—150, N 1.—P. 76—85.
 12. *Towbin H., Staehelin T., Gordon J.* Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1979.—76, N 9.—P. 4350—4354.
 13. *Draber P., Draberova E., Linhartova I., Viklicky V.* Differences in the exposure of C- and N-terminal tubulin domains in cytoplasmic microtubules detected with domain-specific monoclonal antibodies // *J. Cell Sci.*—1989.—92, N 3.—P. 519—528.
 14. *Bartek J., Viklicky V., Horejsi V., Verlova H., Draber P.* Production and characterization of monoclonal antibodies against human transferrin // *Folia biol. (Praha)*—1984.—30, N 2.—P. 137—140.
 15. *Fedde B., Rossier J., Le Caer J. P., Berwald-Netter Y., Koulakoff A., Gros F., Denoulet P.* A combination of posttranslational modifications is responsible for the production of neuronal alpha-tubulin heterogeneity // *J. Cell Biochem.*—1991.—46, N 2.—P. 134—142.
 16. *Laferriere N. B., MacRae T. H., Brown D. L.* Tubulin synthesis and assembly in differentiating neurons // *Biochem. Cell Biol.*—1997.—75, N 2.—P. 103—117.
 17. *Faruki S., Geahlen R. L., Asai D. J.* Syk-dependent phosphorylation of microtubules in activated B-lymphocytes // *J. Cell Sci.*—2000.—113, N 14.—P. 2557—2565.

УДК 577.29; 611.018; 591.8; 577.25
Надійшла до редакції 10.09.02