

АКТИВАЦІЯ ФОСФАТИДИЛІНОЗИТОЛ-3'-КІНАЗНОГО ШЛЯХУ ЛЕКТИНІНДУКОВАНИМ СИГНАЛОМ ЧЕРЕЗ СІАЛОВМІСНІ ГЛІКОПРОТЕЇНИ МЕМБРАН ЛЕЙКОЦИТІВ ПРИ ЦУКРОВОМУ ДІАБЕТИ 1-ГО ТИПУ

Н. О. СИБІРНА¹, М. І. ЗДІОРУК¹, І. В. БРОДЯК¹, М. Л. БАРСЬКА², О. І. ВОВК²

¹Львівський національний університет імені Івана Франка, Україна;

²Інститут біології клітини НАН України, Львів;

e-mail: sybirna_natalia@yahoo.com

Досліджено вплив вортманіну і сіалоспецифічних лектинів на транслокацію р85 α регуляторної субодиниці ензиму фосфатидилінозитол-3'-кінази (PI-3'-кінази) між мембранною та цитозольною фракціями мононуклеарних і поліморфноядерних лейкоцитів у здорових донорів та людей, хворих на цукровий діабет (ЦД) 1-го типу. З'ясовано, що при ЦД 1-го типу в лейкоцитах периферичної крові трансдукція лектиніндукованого сигналу відбувається за активною участю PI-3'-кінази через глікопротеїнові мембранні рецептори, які містять термінальні сіалові кислоти, що зв'язані із субтермінальними вуглеводними залишками ($\alpha 2 \rightarrow 6$) глікозидним зв'язком.

Ключові слова: мононуклеарні лейкоцити, поліморфноядерні лейкоцити, сіалоглікопротеїнові рецептори, фосфатидилінозитол-3'-кіназа, вортманін, сіалоспецифічні лектини, цукровий діабет 1-го типу.

Н а тепер у сучасній молекулярній біології і медицині формується думка про те, що оволодіння способами корекції процесів міграції клітин крові змінить шляхи лікування багатьох хвороб людей, що супроводжуються запаленням, і, в тому числі, діабету та раку.

Рух лейкоцитів у лімфоїдній системі, руслі крові та вихід у периферичні тканини є центральною ефекторною функцією, яка визначає важливість цих клітин для розвитку імунної відповіді за всіх патологій, а особливо при аутоімунних процесах, до яких належить цукровий діабет (ЦД) 1-го типу.

Поліморфноядерні та мононуклеарні лейкоцити (лімфоцити і моноцити) — це імунокомпетентні клітини, які беруть безпосередню участь у виникненні судинних ускладнень внаслідок ЦД [1, 2]. Механізм пошкодження ендотелію судин лейкоцитами ще остаточно не з'ясовано, але відомо, що взаємодію між лейкоцитами та ендотеліоцитами забезпечують три родини адгезивних молекул, більшість з яких входить до складу мембранних рецепторів лейкоцитів і за хімічною структурою є сіалоглікопротеїнами. Збільшення кількості експонованих на поверхні клітин сіалоглікокон'югатів корелює із ушкодженням багатьох типів клітин [3, 4]. За клітинно-клітинних взаємодій важливим може бути не

лише наявність певного вуглеводного компонента (в цьому разі сіалової кислоти), а і вид зв'язку, яким він приєднаний до корової частини олігосахариду. Структура та кількість олігосахаридних ланцюгів глікопротеїнових рецепторів лімфоцитів, з одного боку, впливає на агрегаційні показники цих клітин, а з іншого, — залежить від ступеня зрілості лімфоцитів та може бути маркером вторинного імунодефіцитного стану організму, що характерно для людей, хворих на ЦД 1-го типу [5, 6]. Для дослідження перерозподілу за структурними особливостями та кількості вуглеводних детермінант у складі глікопротеїнових рецепторів клітинної мембрани у нормі та при патології як молекулярні зонди застосовують лектини.

Лейкоцити здатні до амебоїдного руху, який є наслідком дуже складних молекулярних взаємодій між розчинними або тканинозв'язаними хемоатрактантними рецепторами, що сприймають сигнал на поверхні лейкоцитів і ендотелію судин, та структурними елементами цитоскелета цих клітин, які змінюються після сприйняття цього сигналу. Роль хемоатрактантів виконують біологічно активні речовини — хемокіни, що утворюються у вогнищі запалення. Сигнальні мережі за участю ензиму фосфатидилінозитол-3'-кінази (PI-3'-кіназа) безпосередньо задіяні у процеси

сприйняття і передачі сигналів через рецептори плазматичної мембрани лейкоцитів.

У наших попередніх дослідженнях було показано [7–10], що індукована сіалоспецифічними лектинами агрегація лейкоцитів здорових та хворих на ЦД 1-го типу людей значно знижувалася після дії на клітини вортманіну – селективного неконкурентного інгібітора PI-3'-кінази. Інгібувальний ефект вортманіну відносно сіалоспецифічної лектиніндукованої агрегації лейкоцитів свідчить про те, що PI-3'-кіназа залучена у шлях трансдукції клітинного сигналу, який сприймається сіалоглікопротеїновими рецепторами мононуклеарних та поліморфноядерних лейкоцитів [7–10]. Існують докази того, що PI-3'-кіназа і її ліпідні продукти відіграють важливу роль у реорганізації актинового цитоскелета і клітинній міграції [11, 12]. У клітинах із мутантною, конститутивно активованою PI-3'-кіназою ініціюється клітинна рухливість та утворення рафтів на мембрані. Аналогічний ефект спостерігався у разі збільшення рівня екзогенного фосфатидилінозитол-(3,4,5)-трифосфату [13, 14]. Також було відзначено, що після дії вортманіну сповільнюється процес хемотаксису, на основі чого було зроблено висновки про залучення PI-3'-кінази у хемокініндуковану клітинну міграцію [15].

З огляду на дані літератури та результати власних попередніх досліджень, метою нашої роботи було вивчення динаміки транслокації між мембранною та цитозольною фракціями p85 α регуляторної субодиниці PI-3'-кінази за умов індукції агрегації лейкоцитів різними сіалоспецифічними лектинами в нормі та при ЦД 1-го типу, а також з'ясування впливу вортманіну на цей процес.

Матеріали і методи

Інкубація та лізис клітин. Об'єктом дослідження слугували поліморфноядерні та мононуклеарні лейкоцити з периферичної крові здорових (контроль, К) та хворих на ЦД 1-го типу людей (дослід, Д). Відбір хворих на ЦД 1-го типу проводили на базі ендокринологічного відділення згідно з угодою про співпрацю між 4-ю міською лікарнею та кафедрою біохімії біологічного факультету Львівського національного університету імені Івана Франка. Усі хворі були інформовані лікарем щодо проведення цих досліджень та їхньої мети. Кров із вени збирали у стерильні силіконові пробірки, в які попередньо вносили гепарин у співвідношенні 1 : 10 (гепарин : цільна кров). Поліморфноядерні та мононуклеарні

лейкоцити виділяли у градієнті густини ($1,115 \pm 0,002$ г/см³ при 20 °С) Gradisol-G (Aqua-medica, Польща) центрифугуванням згідно з інструкцією фірми-виробника. Після центрифугування клітини двічі відмивали розчином Хенкса (рН 7,2). Гемоліз залишкових еритроцитів у фракції поліморфноядерних лейкоцитів здійснювали з використанням 0,83%-го водного розчину хлориду амонію. Життєздатність клітин у тесті із трипановим синім була не менше 98%. Після підрахунку клітин проводили двоетапну інкубацію суспензії поліморфноядерних та мононуклеарних лейкоцитів. На першому етапі клітини інкубували із вортманіном при 37 °С впродовж 10 хв (кінцева концентрація вортманіну у суспензії клітин 100 нМ). Після завершення інкубації суспензії поліморфноядерних та мононуклеарних лейкоцитів центрифугували при 300 g протягом 5 хв. Потім забирали надосадову рідину, в якій містився вортманін. Осади клітин ресуспендували розчином Хенкса та інкубували впродовж певного проміжку часу з додаванням лектинів у концентрації 32 мкг/мл.

Для дослідження транслокації регуляторної субодиниці PI-3'-кінази, лейкоцити інкубували з такими лектинами як MAA (Sigma, США), SNA і WGA (Лектинотест, Україна): WGA – лектин зародків пшениці (специфічний до N-ацетил- β ,D-глюкозаміну – β ,DglcNAc і N-ацетилнейрамінової кислоти – NeuNAc); MAA – лектин акації амурської (афінний до послідовності NeuNAc(α 2 \rightarrow 3)DGal/DgalNAc, не зв'язує при цьому дисахаридних фрагментів з (α 2 \rightarrow 6) глікозидним зв'язком); SNA – лектин бузини чорної (специфічний до послідовності NeuNAc(α 2 \rightarrow 6)DGal/DgalNAc, не зв'язує при цьому NeuNAc(α 2 \rightarrow 3)DGal/DgalNAc послідовності в олігосахарідах).

Інкубацію із сіалоспецифічними лектинами проводили при 37 °С з різними часовими інтервалами (0,5; 1; 2; 15 хв), після чого суспензії поліморфноядерних та мононуклеарних лейкоцитів центрифугували при 300 g протягом 5 хв, відбирали надосадову рідину, а осад лейкоцитів лізували, виділяли мембранну та цитозольну фракції. Всі операції з виділення фракцій проводили при 4 °С.

Лізис лейкоцитів (10×10^6 клітин/200 мкл буфера) проводили при 4 °С протягом 30 хв у гіпотонічному буфері наступного складу: 10 мМ трис-HCl (рН 7,5), 1,5 мМ MgCl₂, 5 мМ EDTA, 5 мМ EGTA, 0,25 мМ Na₃VO₄ та 1 мМ фенілметилсульфонілфторид, 5 мМ бензамідин, 10 мкг/мл апротиніну,

10 мкг/мл лейпептину, 2 мкг/мл пепстатину (Sigma, США). Після гомогенізування та лізису зразки центрифугували (10 хв при 20 000 g, 4 °С), відбирали цитозольну фракцію лейкоцитів, яку використовували у подальшому для імуноблотаналізу, а осад ресуспендували у 200 мкл 10 мМ трис-НСІ буфера (рН 7,5) та додавали 2 М сахарозу (кінцева концентрація 0,25 М). Після центрифугування при 2 000 g впродовж 20 хв при 4 °С відбирали супернатант і додавали 1/3 за об'ємом гіпотонічного буфера. Осад фракції плазматичних мембран одержували центрифугуванням при 20 000 g протягом 90 хв при 4 °С, ресуспендували у мінімальній кількості 10 мМ трис-НСІ буфера, рН 7,5. Вихід одержаних фракцій розраховували за концентрацією протеїну, яку оцінювали методом G. Peterson [16].

Електрофорез протеїнів у поліакриламідному гелі. Протеїни розділяли електрофоретично у блоках 10%-го ПААГ за наявності SDS у буферній системі Леммлі.

Електрофоретичне розділення проводили при силі струму 20 мА, напрузі 200 В та потужності 50 Вт на пластинку протягом 4 год. Для визначення молекулярної маси протеїнів, розділених методом електрофорезу, використовували протеїнові стандарти фірми «Fermentas».

Для проведення електрофоретичного аналізу зразків лізатів лейкоцитів їх прогрівали при 95 °С протягом 5 хв у буфері Леммлі (62,5 мМ трис-НСІ (рН 6,8), 1 мМ EDTA, 2%-й SDS, 5%-й β-меркаптоетанол, 10%-й гліцерол, 0,4%-й бромфеноловий синій).

Імуноблотинг протеїнів. В основу методу покладено перенесення протеїнів із ПААГ на нітроцелюлозну мембрану під дією електричного поля з наступною обробкою одержаних блотів антитілами. Перенесення проводили протягом 2 год при силі струму 250 мА, напрузі 200 В та потужності 50 Вт у буфері, що містив: 25 мМ трис-НСІ, рН 8,3; 20%-й метанол (об'єм/об'єм); 192 мМ гліцин; 0,1%-й SDS. Вільні центри зв'язування на мембрані блокували протягом 1 год 2%-им BSA (маса/об'єм, Sigma, США) в ЗФР (137 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, 4,3 мМ Na₂HPO₄, 1,7 мМ KH₂PO₄, рН 7,3) з 0,05%-им твін-20 (об'єм/об'єм). Відповідно до поставленої мети мембрану інкубували з першими антитілами (моноклональні антитіла до р85α, Millipore, США) у блокуючому буфері протягом 2 год з наступним промиванням цим же буфером (5 разів по 3 хв). Як другі антитіла використовували антимишачі IgG (Millipore, США), кон'юговані з пероксида-

зою хрому. Інкубацію із другими антитілами проводили протягом 1 год. Вирівнювання за протеїном в досліджуваних зразках проводили вимірюючи інтенсивність сигналу імунореактивних смуг, які виявлялися під час застосування моноклональних анти-β-актин антитіл (Sigma, США). Імунореактивні смуги на блотах виявляли за допомогою набору для посиленої хемілюмінесценції (Amersham, Велика Британія). Плівку проявляли у стандартному фенідон-гідрохіноновому проявнику та фіксували кислим фіксажем.

Результати та обговорення

Виявлені в наших попередніх дослідженнях [7, 8, 10] зміни параметрів лектин-індукованої агрегації лейкоцитів здорових і хворих на ЦД 1-го типу людей після преінкубації клітин з інгібітором PI-3'-кінази – вортманіном, стали підґрунтям для формування гіпотези про порушення у функціонуванні PI-3'-кіназозалежних сигнальних мереж у лейкоцитах при ЦД 1-го типу. Для одержання експериментальних підтверджень цієї гіпотези необхідно було з'ясувати процес трансдукції лектинового сигналу через сіаловмісні глікопротеїнові рецептори мембран лейкоцитів за участю PI-3'-кіназного шляху під впливом вортманіну та у разі індукції агрегації лейкоцитів сіалоспецифічними лектинами.

PI-3'-кіназа є одним із важливих регуляторних ензимів, який причетний до різноманітних сигнальних шляхів і контролює ключові функції клітини, а тому може бути залученим у молекулярні механізми формування патологічних процесів у разі захворювання на діабет. Внаслідок проведених шляхом Вестерн блот-аналізу досліджень, виявлено імунореактивні смуги у мембранній та цитозольній фракціях поліморфноядерних і мононуклеарних лейкоцитів як у контрольних зразках, так і за ЦД 1-го типу (рис. 1, 2).

У поліморфноядерних лейкоцитах здорових людей р85α регуляторна субодиниця PI-3'-кінази детектувалася із розподілом між цитозольною та мембранною фракціями як 20% до 80% (рис. 1). За ЦД відбувалася преактивація нейтрофільних гранулоцитів, що виражалось у передчасній дегрануляції цих клітин [17, 18]. Участь PI-3'-кінази в молекулярних механізмах, що опосередковують зміну морфофункціонального стану нейтрофілів при ЦД, підтверджується повною транслокацією р85α регуляторної субодиниці PI-3'-кінази із мембранної фракції у цитозольну, вміст якої у цитозолі в умовах патології досягає 95%, що у

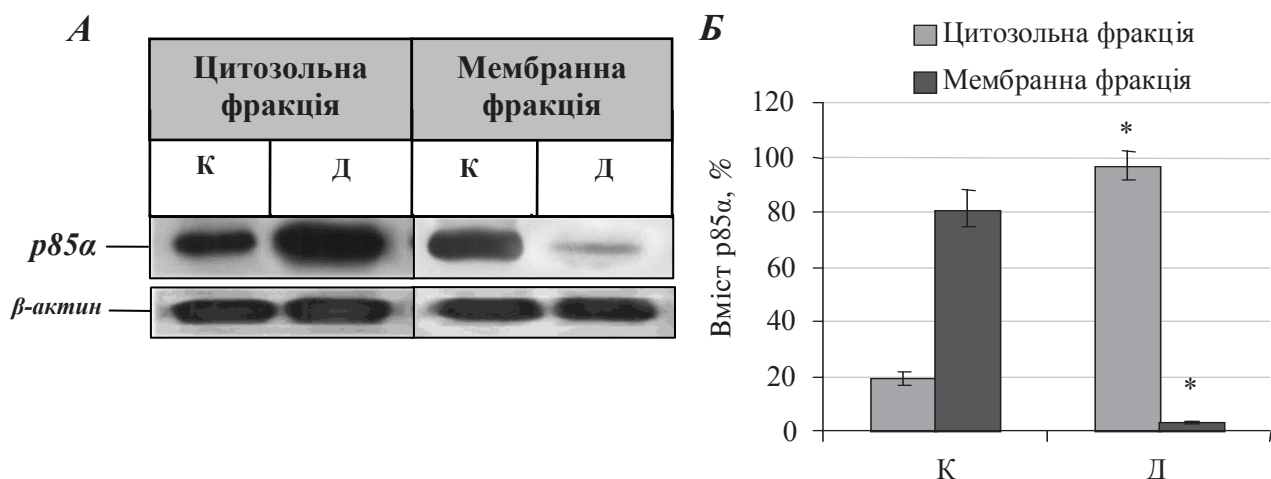


Рис. 1. Імуноблот-аналіз протеїнів цитозольної та мембранної фракцій поліморфноядерних лейкоцитів здорових (К) та хворих на ЦД 1-го типу (Д) людей, з використанням антитіл до р85α регуляторної субодиниці РІ-3'-кінази (А) та розподіл (за вмістом, у %) р85α регуляторної субодиниці (Б)

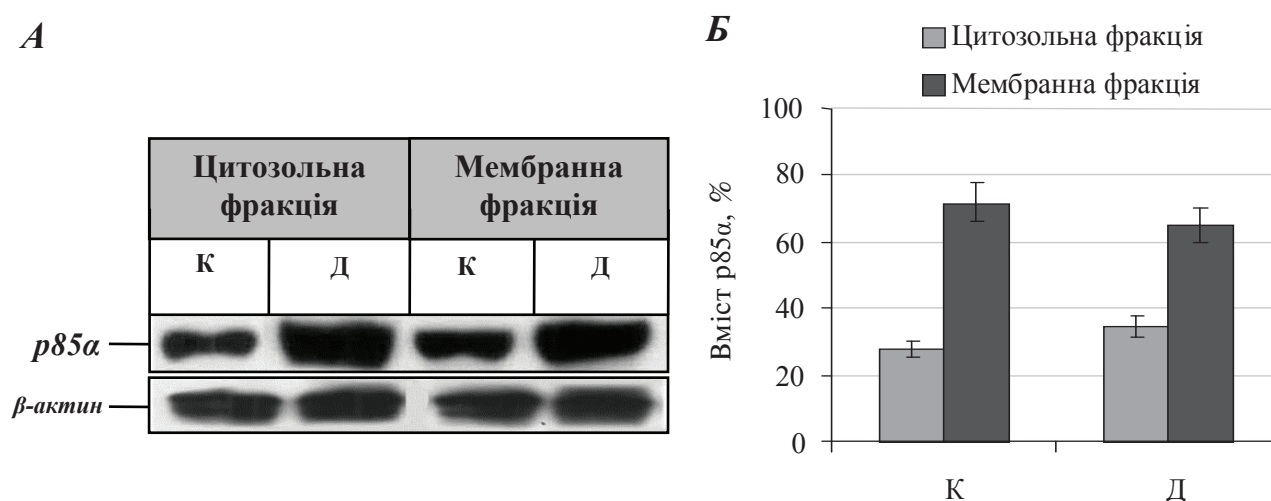


Рис. 2. Імуноблот-аналіз протеїнів цитозольної та мембранної фракцій мононуклеарних лейкоцитів здорових (К) та хворих на ЦД 1-го типу (Д) людей з використанням антитіл до р85α регуляторної субодиниці РІ-3'-кінази (А) та розподіл (за вмістом, у %) р85α регуляторної субодиниці (Б)

4,5 раза більше, ніж у нормі (рис. 1). Є дані про те, що у поліморфноядерних нейтрофілах РІ-3'-кіназа частково локалізується в цитоплазматичних ліпідних тільцях [19]. У нейтрофільних гранулоцитах РІ-3'-кіназа бере участь у проведенні клітинної відповіді з мембран внутрішньоклітинних гранул і, в тому числі, з доменів ліпідних тілець, а, отже, може бути задіяна у процеси передчасної дегрануляції нейтрофілів, що є етіологічною основою багатьох ускладнень при діабеті.

У мононуклеарних лейкоцитах контрольних зразків рівень р85α регуляторної

субодиниці РІ-3'-кінази переважає у мембранній фракції (70%) порівняно з цитозольною фракцією (30%) (рис. 2). В умовах ЦД 1-го типу в мононуклеарних лейкоцитах рівень р85α регуляторної субодиниці РІ-3'-кінази також переважає у мембранній (60%) фракції порівняно з цитозольною (40%) фракцією (рис. 2).

Транслокація р85α регуляторної субодиниці РІ-3'-кінази в мембранну фракцію мононуклеарів периферичної крові дає експериментальне підґрунтя стверджувати, що в умовах діабету РІ-3'-кіназа

перебуває в активному стані, фосфорилує фосфатидилінозитолі, які беруть участь у проведенні внутрішньоклітинного сигналу. Внаслідок цього у клітинах крові мононуклеарного ряду можуть формуватися стресові фібрили, утворюватися ламелоподії та філоподії, реорганізуватися актиновий цитоскелет, що змінює морфологічний стан клітин і їхню здатність до руху. Тривале перебування клітин у такому субактивованому стані призводить до виснаження мононуклеарних лейкоцитів, що виявляється у порушенні імунного захисту людей, хворих на ЦД.

Таким чином, при ЦД 1-го типу в поліморфноядерних лейкоцитах PI-3'-кіназа, здебільшого, опосередковує внутрішньоклітинне ліпідне сигналювання у разі рецептор-опосередкованої активації нейтрофілів, везикулярного транспортування, реорганізації цитоскелета та передчасної дегрануляції цих клітин. У моноцитах і лімфоцитах PI-3'-кіназа при ЦД сприяє посиленню інвазивності, здатності до деформації, а також до рециркуляції мононуклеарів.

Для виділення компонентів монофакторного незалежного впливу вортманіну та диметилсульфоксиду (DMSO, розчинник для вортманіну) на сіалоглікопротеїнові рецептори лейкоцитів було проведено інкубацію досліджених клітин у присутності цих реактивів (37 °С, 10 хв) із наступним лізисом клітин і Вестерн-блот аналізом.

Досліджено вплив вортманіну і DMSO на перерозподіл p85 α регуляторної субодиниці PI-3'-кінази між мембранною та цитозольною фракціями лізатів мононуклеарів здорових людей. Виявлено, що без дії лектинів на індукуючу агрегаційну активність лейкоцитів ні вортманін, ні DMSO не впливають на рівень перерозподілу p85 α регуляторної субодиниці PI-3'-кінази між мембранною і цитозолем. У мононуклеарах вміст p85 α залишався у цитозольній фракції в межах 30%, а у мембранній – 70% (рис. 3). Аналогічні результати були одержані на лізатах мононуклеарних лейкоцитів людей, хворих на ЦД 1-го типу.

На наступному етапі досліджень ми вивчали вплив вортманіну на динаміку процесу транслокації p85 α регуляторної субодиниці PI-3'-кінази між цитозольною та мембранною фракціями лізатів лейкоцитів здорових та хворих на ЦД 1-го типу людей за дії сіалоспецифічних лектинів.

Використання трьох різних сіалоспецифічних лектинів дозволило провести реестрацію сигналів від індукторів агрегації спільним пулом сіалованих глікокон'югатів (за використання WGA) та диференціювати глікозидні зв'язки термінальних сіалових кислот із субтермінальними вуглеводами: SNA – зв'язки ($\alpha 2 \rightarrow 6$), а MAA – зв'язки ($\alpha 2 \rightarrow 3$).

Лектин WGA, взаємодіючи із залишками сіалових кислот олігоцукрових компонентів поверхневих глікокон'югатів лейкоцитів,

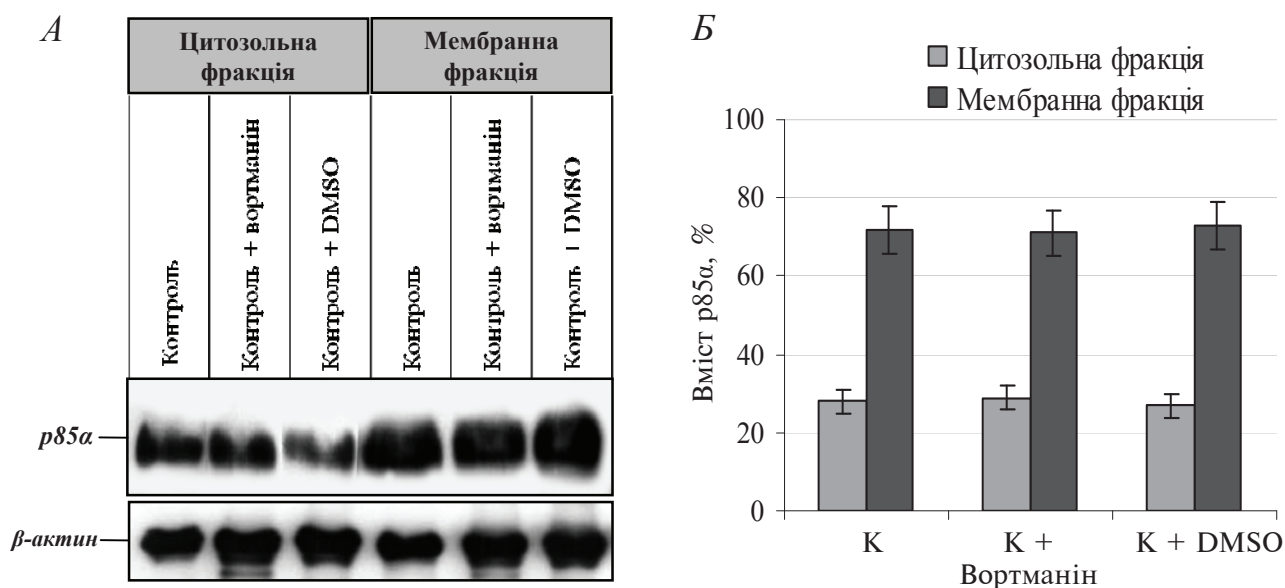


Рис. 3. Імуноблот-аналіз протеїнів цитозольної та мембранної фракції мононуклеарних лейкоцитів здорових донорів (в умовах преінкубації з вортманіном або DMSO) з використанням антитіл до p85 α регуляторної субодиниці PI-3'-кінази (А) та розподіл (за вмістом, у %) p85 α регуляторної субодиниці (Б)

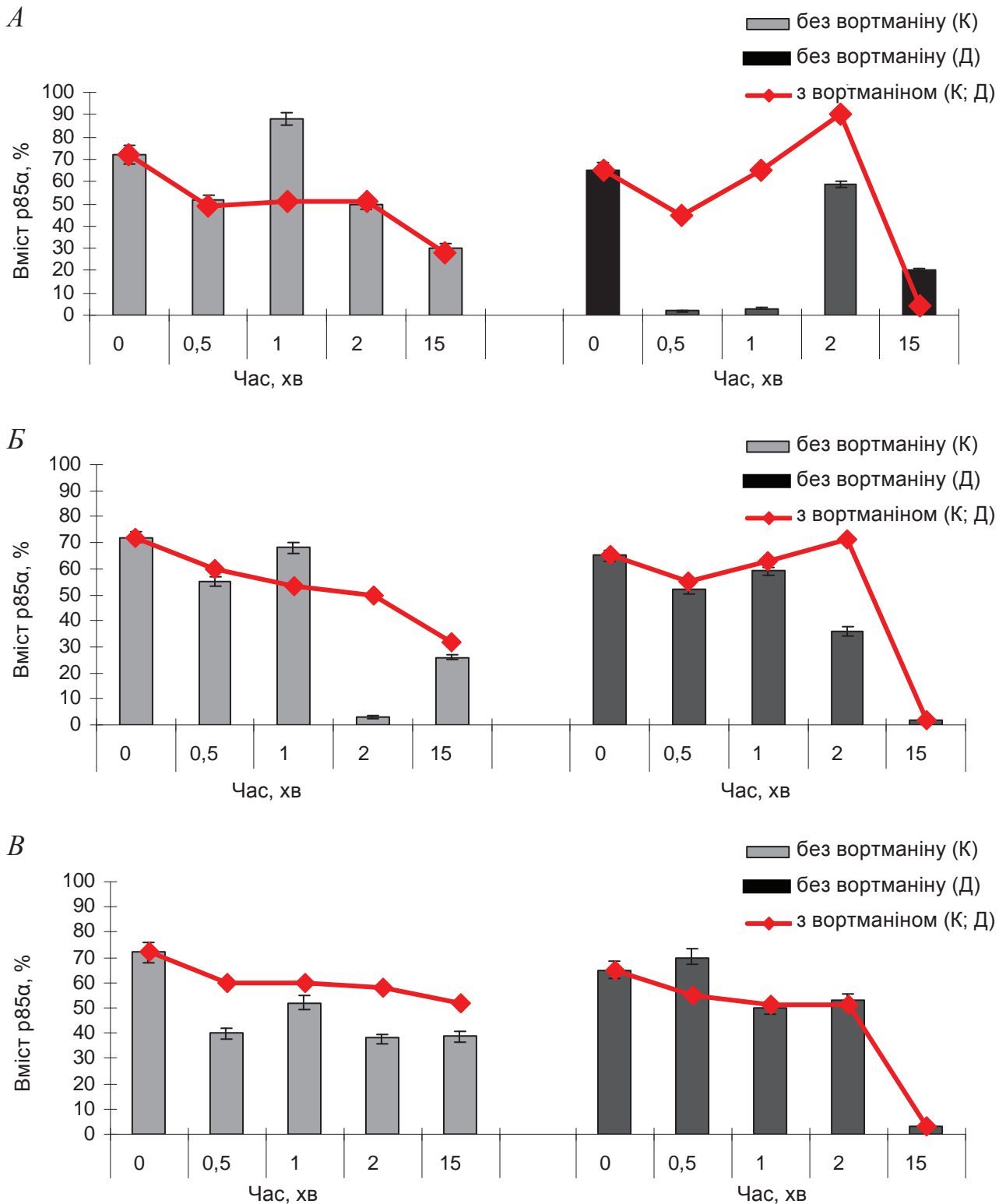


Рис. 4. Вплив вортманіну та лектинів: WGA (А), МАА (Б) та SNA (В) на вміст у мембранній фракції р85α регуляторної субодиниці Р1-3'-кінази мононуклеарних лейкоцитів у крові здорових (К) та хворих на ЦД 1-го типу (Д) людей залежно від часу.

Примітка. Тут і далі. Рівень р85α у лізатах лейкоцитів приймали за 100%, рахували вміст р85α регуляторної субодиниці у мембранній і цитозольній фракціях окремо, виражали у %

характеризує сумарну відповідь, яка зумовлена проведенням сигналу через ($\alpha 2 \rightarrow 3$)- і $\alpha(2 \rightarrow 6)$ -зв'язані сіалові кислоти. Із представлених діаграм (рис. 4, А), видно як формується трансдукція зовнішнього сигналу через PI-3'-кіназний сигнальний шлях. У здорових донорів на 30-й сек зареєстровано частковий вихід p85 α у цитозольну фракцію, вірогідно, для формування димерної форми ензиму, тобто для приєднання субодиниці p110 δ [19, 20]. Активна форма ензиму транслокується у мембранну фракцію через 1 хв після інкубації з лектином, коли вміст p85 α регуляторної субодиниці найвищий. Очевидно, включення сигнальної мережі у таких експериментальних умовах відбувалося саме через 1 хв. Зменшення вмісту досліджуваної субодиниці ензиму на 2-гу та 15-ту хв відображає процес повернення p85 α у цитозольну фракцію після виконання своєї функції [19, 20]. В умовах ЦД чітко прослідковується затримка формування передачі зовнішнього імпульсу після дії сіалоспецифічного лектину, що виявляється у радикальному переміщенні p85 α у цитозольну фракцію на 30-ту сек і 1-шу хв, і лише на 2-й хв вміст p85 α регуляторної субодиниці PI-3'-кінази у мембрані засвідчує включення сигнального шляху.

У разі дії вортманіну на мононуклеари здорових донорів, транслокація p85 α регуляторної субодиниці у відповідь на індукуючий сигнал лектину відбувається за іншою динамікою порівняно з індукуючим впливом лектину WGA. Як видно (рис. 4, А), на 1-й хв інкубації лейкоцитів із WGA відбувається пригнічення транслокації, що вказує на чіткий інгібуючий вплив вортманіну і неможливість формування сигнального шляху для трансдукції позаклітинного сигналу (рис. 4, А). Це пояснює відсутнє і стрімке пригнічення агрегаційних властивостей лейкоцитів цього виду, що показано у наших попередніх дослідженнях [7, 8, 10].

Вортманін в умовах ЦД не виявляє інгібуючого впливу на процес транслокації p85 α у мембранну фракцію аж до 15-ї хв, коли відбувається повне переміщення досліджуваної субодиниці з мембрани у цитозоль. Одержані результати вказують на надзвичайну сповільненість та розрегульованість PI-3'-кіназного сигнального шляху у мононуклеарних лейкоцитах периферичної крові хворих на ЦД 1-го типу.

Аналізуючи за аналогічним алгоритмом дані, одержані за дії лектину МАА (рис. 4, Б), потрібно відзначити, що подібність результатів

вказує на важливу роль у сприйнятті індукуючого сигналу сіалових кислот, приєднаних ($\alpha 2 \rightarrow 3$) глікозидним зв'язком до субтермінальних моносахаридів у вуглеводних детермінантах глікопротеїнових рецепторів мононуклеарів. Звертає на себе увагу і те, що при ЦД час відповіді на індукуючий сигнал не відтермінується. Вортманін діє за цих умов аналогічно до описаних для лектину WGA.

Іншою була картина впливу лектину SNA (рис. 4, Б), який характеризується афінністю до ($\alpha 2 \rightarrow 6$)-приєднаних сіалових кислот. У здорових донорів транслокація p85 α регуляторної субодиниці PI-3'-кінази була абсолютно незалежною від вортманіну, тоді як при патології (пришвидшена до 30-ї сек) інгібувалася вортманіном. Пришвидшення формування відповіді на індукуючий агрегацію сигнал і залежність від вортманіну можна пов'язати із переключенням проведення PI-3'-кіназозалежного сигналу на ($\alpha 2 \rightarrow 6$)-приєднані сіалові кислоти у структурі вуглеводних детермінант мононуклеарів при ЦД. Методом лектиніндукованої агрегації мононуклеарів нами було виявлено, що внаслідок ЦД у структурі сіалоглікопротеїнових рецепторів мембран мононуклеарних лейкоцитів кількість дисахаридних фрагментів NeuNAc($\alpha 2 \rightarrow 6$)DGal/DgalNAc не змінюється, але знижується вміст NeuNAc($\alpha 2 \rightarrow 3$)DGal/DgalNAc-дисахаридів, а вортманін виражено інгібує дію лектину SNA порівняно з лектином МАА [7, 8]. Таким чином, у мононуклеарних лейкоцитах здорових людей вортманін більшою мірою інгібує трансдукцію лектинового сигналу за активною участю PI-3'-кінази через глікопротеїнові рецептори, які містять термінальні сіалові кислоти, що зв'язані із субтермінальними залишками галактози чи N-ацетилгалактозаміну ($\alpha 2 \rightarrow 3$) глікозидними зв'язками, тоді як при ЦД 1-го типу – через термінальні сіалові кислоти пов'язані із субтермінальними залишками ($\alpha 2 \rightarrow 6$) глікозидними зв'язками.

Одержані результати для поліморфноядерних лейкоцитів (рис. 5) відрізняються від мононуклеарних клітин (рис. 4). Це, звичайно, пов'язано з різним функціональним навантаженням цих лейкоцитарних ліній. У здорових людей пік формування PI-3'-кіназозалежного сигналу за дії лектинів WGA та МАА зафіксовано на 2-гу хв, а для SNA – на 15-ту хв (рис. 5), тоді як в умовах ЦД 1-го типу цей процес прискорено до 1-ї хв. Як показано у наших попередніх дослідженнях [7, 8, 10], прискорене формування відповіді на SNA-індукуючий агрегацію сигнал, ймовірно, мож-

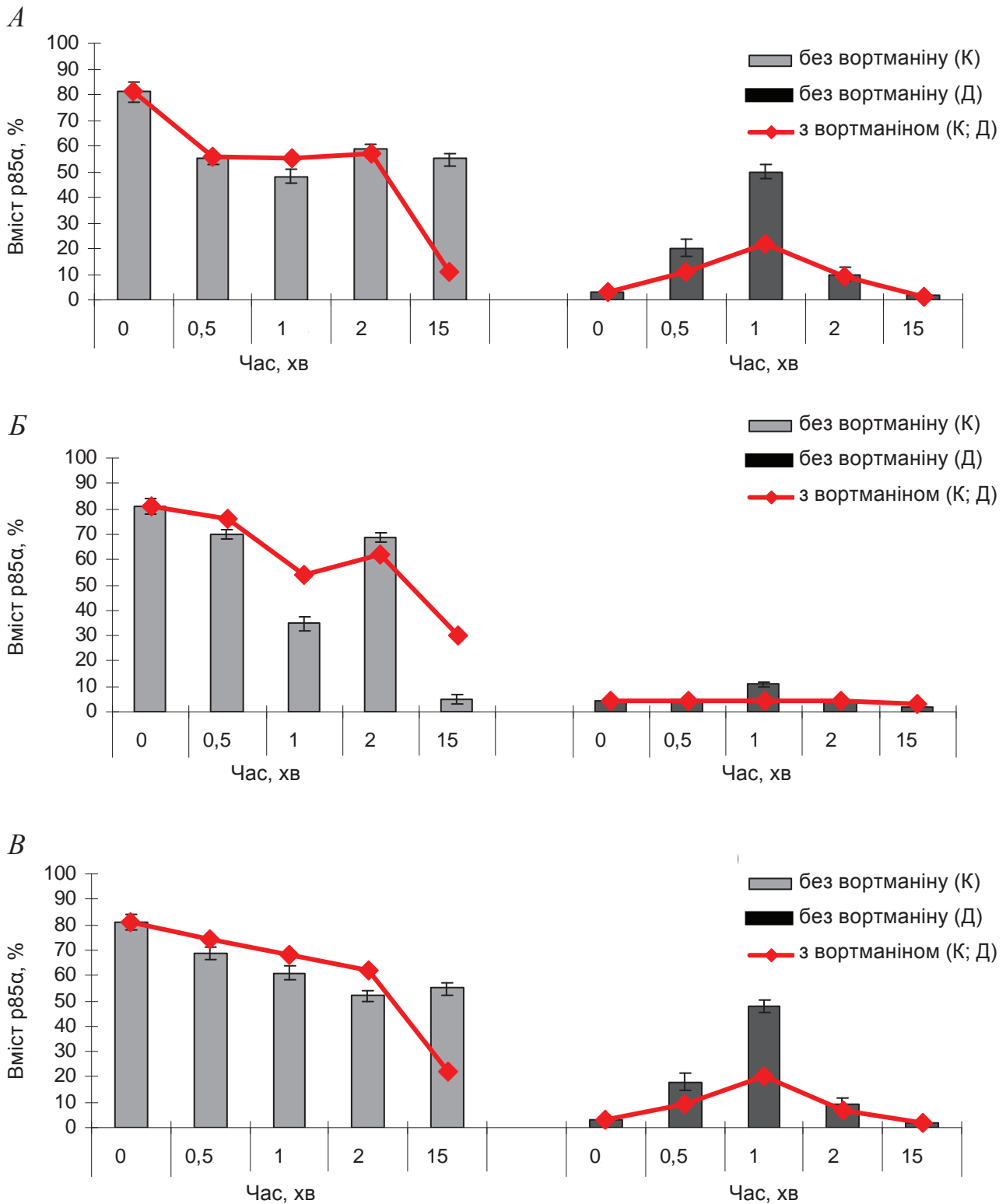


Рис. 5. Вплив вортманіну та лектинів: WGA (А), МАА (Б) та SNA (В) на вміст у мембранній фракції р85α регуляторної субодиниці P1-3'-кінази поліморфноядерних лейкоцитів у крові здорових (К) та хворих на ЦД 1-го типу (Д) людей залежно від часу

на пов'язати зі збільшенням кількості ($\alpha 2 \rightarrow 6$)-приєднаних сіалових кислот у структурі вуглеводних детермінант поліморфноядерних лейкоцитів при ЦД 1-го типу.

Експериментальні дані можуть свідчити про те, що р85 α регуляторна субодиниця у разі стимуляції поліморфноядерних лейкоцитів лектинами WGA, SNA і MAA транслокується з мембранної фракції у цитозоль. У цитозолі р85 α утворює комплекси із фосфорильованими протеїнами внутрішньоклітинних гранул та об'єднується із каталітичною субодиницею PI-3'-кінази [19]. Асоціація та активація субодиниць ліпофільної PI-3'-кінази ініціює клітинну відповідь та дегрануляцію нейтрофілів.

Вірогідно основний внесок у формуванні PI-3'-кіназозалежного сигнального шляху при досліджуваній патології можуть вносити рецептори мембран поліморфноядерних лейкоцитів, у структурі яких переважають дисахаридні фрагменти – NeuNAc($\alpha 2 \rightarrow 6$)DGal/DgalNAc (рис. 5, А, В). Взаємодія глікокон'югатів плазматичної мембрани лейкоцитів хворих на ЦД із лектином MAA помітно пригнічена порівняно з контролем (рис. 5, В).

Внаслідок дії вортманіну в умовах ЦД 1-го типу відбувається зменшення ступеня, але не характеру, транслокації досліджуваної субодиниці із мембранної фракції у цитозоль. Отже, у нейтрофільних гранулоцитах вортманін лише частково змінює інтенсивність транслокації у відповідь на дію сіалоспецифічних лектинів. Це узгоджується з даними літератури про те, що у цих клітинах вортманін не впливає ні на рівень фосфорильовання р85-асоційованих протеїнів, ні на здатність р85 α регуляторної субодиниці зв'язуватися із тирозин-фосфорильованими протеїнами. Ефект інгібування PI-3'-кінази за дії вортманіну виключно спрямований на каталітичну субодиницю цього ензиму [20].

Узагальнюючи одержані результати, можна дійти висновку, що у людей, хворих на ЦД 1-го типу, процес ($\alpha 2 \rightarrow 6$)-сіалювання лейкоцитарних глікопротеїнів стає домінуючим. Досліджувана патологія супроводжується збільшенням місць зв'язування для лектину SNA, що може свідчити про заміну ($\alpha 2 \rightarrow 3$)-зв'язаних сіалових кислот на ($\alpha 2 \rightarrow 6$)-зв'язані. Модифікація типу глікозидного зв'язку, можливо, спричинена *de novo* в цих клітинах внаслідок зміни кількості або активності ензиму ($\alpha 2 \rightarrow 6$)-сіалілтрансферази.

Таким чином, дослідження динаміки транслокації р85 α регуляторної субодиниці PI-3'-кінази методом імуноблот-аналізу

засвідчило, що в нормі у PI-3'-кіназний шлях передачі сигналу як у мононуклеарні лейкоцити, так і у нейтрофільні гранулоцити, більшою мірою задіяні сіалоглікопротеїнові рецептори, які у своїй структурі мають термінальні сіалові кислоти, пов'язані із субтермінальними залишками галактози та N-ацетилгалактозаміну ($\alpha 2 \rightarrow 3$) глікозидним зв'язком.

В умовах ЦД 1-го типу трансдукція лектиніндукованого сигналу, очевидно, відбувається за активною участю PI-3'-кінази через глікопротеїнові рецептори, які містять термінальні сіалові кислоти, що зв'язані із субтермінальними залишками галактози чи N-ацетилгалактозаміну ($\alpha 2 \rightarrow 6$) глікозидними зв'язками.

**АКТИВАЦІЯ
ФОСФАТИДИЛИНОЗИТОЛ-
3'-КИНАЗНОГО ПУТИ
ЛЕКТИНИНДУЦІРОВАННИМ
СИГНАЛОМ ЧЕРЕЗ
СИАЛОСОДЕРЖАЩІЕ
ГЛИКОПРОТЕИНЫ МЕМБРАН
ЛЕЙКОЦИТОВ ПРИ САХАРНОМ
ДИАБЕТЕ 1-го ТИПА**

*Н. А. Сибирная¹, Н. И. Здиорук¹,
И. В. Бродяк¹, М. Л. Барская², Е. И. Вовк²*

¹Львовский национальный университет
имени Ивана Франко, Украина;

²Институт биологии клетки НАН Украины, Львов;
e-mail: sybirna_natalia@yahoo.com

Исследовано влияние вортманнина и сиалоспецифических лектинов на транслокацию р85 α регуляторной субъединицы энзима фосфатидилинозитол-3'-киназы (PI-3'-киназы) между мембранной и цитозольной фракциями мононуклеарных и полиморфноядерных лейкоцитов у здоровых доноров и людей, больных сахарным диабетом (СД) 1-го типа. Выяснено, что при СД 1-го типа в лейкоцитах периферической крови трансдукция лектининдуцированного сигнала происходит при активном участии PI-3'-киназы через гликопротеиновые мембранные рецепторы, содержащие терминальные сиаловые кислоты, связанные с субтерминальными углеводными остатками ($\alpha 2 \rightarrow 6$) гликозидной связью.

Ключевые слова: мононуклеарные лейкоциты, полиморфноядерные лейкоциты, сиалогликопротеиновые рецепторы, фосфатидилинозитол-3'-киназа, вортманнин, сиалоспецифические лектины, сахарный диабет 1-го типа.

ACTIVATION OF THE PHOSPHATIDYLINOSITOL-3'-KINASE PATHWAY WITH LECTIN-INDUCED SIGNAL THROUGH SIALO-CONTAINING GLYCOPROTEINS OF LEUKOCYTE MEMBRANES UNDER TYPE 1 DIABETES MELLITUS

N. Sybirna¹, M. Zdioruk¹, I. Brodyak¹, M. Bars'ka², O. Vovk²

¹Ivan Franko National University of Lviv, Ukraine;

²Institute of Cell Biology, National Academy of Sciences of Ukraine, Lviv; e-mail: sybirna_natalia@yahoo.com

S u m m a r y

The influence of wortmannin and sialospecific lectins on the translocation of p85 α regulatory subunit of phosphatidylinositol-3'-kinase (PI-3'-kinase) between membrane and cytosolic fractions of the mononuclear and polymorphonuclear leukocytes in healthy donors and patients with type 1 diabetes mellitus (DM) was investigated. It was found out that under type 1 DM PI-3'-kinase takes active part in the transduction of lectin-induced signal through membrane glycoprotein receptors that contain terminal sialic acids linked to subterminal carbohydrate residues with (α 2 \rightarrow 6) glycosidic bond.

Key words: mononuclear leukocytes, polymorphonuclear leukocytes, sialoglycoprotein receptors, sialospecific lectins, phosphatidylinositol-3'-kinase, wortmannin, type 1 diabetes mellitus.

1. Александровский Я. А. // Биохимия. — 2002. — **67**, № 12. — С. 1611–1631.
2. Asada M., Furukawa K., Kantor C. et al. // Biochemistry. — 1991. — **30**, N 6. — P. 1561–71.
3. Fajka-Boja R., Vegi M., Shoenfeld Y. et al. // International J. Oncology. — 2002. — **20**. — P. 563–570.

4. Harduin-Lepers A., Mollicone R., Delannoy P., Oriol R. // Glycobiology. — 2005. — **15**. — P. 805–817.
5. Angata T., Varki A. // Chem Rev. — 2002. — **102**. — P. 439–470.
6. Clevers H., Dunlap S., Terhorst C. // Europ. J. Immunology. — 2005 — **18**, N 5. — P. 705–10.
7. Здіорук М. І., Барська М. Л., Бродяк І. В. та ін. // Біологічні студії. — 2009. — **3**, № 2. — С. 133–140.
8. Здіорук М. І., Бродяк І. В., Сибірна Н. О. // Там само. — 2011. — **5**, № 1. — С. 85–96.
9. Zdioruk M., Brodyak I., Drel V., Sybirna N. // Annales universitatis Mariae Curie-Sklodovska. Sectio DDD. Pharmacia 2. — 2010. — **XXIII**, N 2 (34). — P. 227–231.
10. Sybirna N., Brodyak I., Zdioruk M., Barska M. // Sepsis. — 2011. — **4**, N 1. — P. 47–55.
11. Chang Y., Chan Y., Jackson D. et al. // J. Immunol. — 2006. — **176**, N 1. — P. 173–80.
12. Stephens L., Jackson T., Hawkins P. T. // J. Biol. Chem. — 1993. — **268**, N 17. — P. 162–172.
13. Varki A. // Nature. — 2007. — **446**. — P. 1023–1029.
14. Traynor-Kaplan A. E., Thompson B. L., Harris A. L. et al. // J. Biol. Chem. — 1989. — **264**. — P. 15668–15673.
15. Aiba Y., Kameyama M., Yamazaki T. et al. // Blood. — 2008. — **111**, N 3. — P. 1497–1503.
16. Peterson G. L. // Anal. Biochem. — 1977. — **83**, N 2. — P. 346–356.
17. Dodd R. B., Drickamer K. // Glycobiology. — 2001. — **11**. — P. 71R–79R.
18. Сибірна Н. О., Барська М. Л., Лаповець Л. Є. // Лаб. діагностика. — 2003. — № 4. — С. 47–50.
19. Wengui Yu., Cassara J., Peter F. Weller. // Blood. — 2000. — **95**, N 3. — P. 1078–1085.
20. Matsuo T., Hazeki K., Hazeki O. et al. // Biochem. J. — 1996. — **315**. — P. 505–512.

Отримано 01.07.2011