© Коллектив авторов, 1997
УДК 577.156:612.014.462:597.82

Я.Ю.Багров, Н.И.Дмитриева, Н.Б.Манусова

РОЛЬ ТИРОЗИНОВЫХ ПРОТЕИНКИНАЗ В РЕГУЛЯЦИИ АНТИДИУРЕТИЧЕСКОГО ЭФФЕКТА АРГИНИН-ВАЗОПРЕССИНА

Ya.Yu.Bagrov, N.I.Dmitrieva, N.B.Manusova

THE ROLE OF TYROSINE PROTEIN KINASES IN THE CONTROL OF ANTIDIURETIC EFFECT OF ARGININE VASOPRESSIN

Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М.Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия

РЕФЕРАТ

Исследовали роль тирозиновых протеинкиназ (ТК) в регуляции водного транспорта, стимулированного аргинин-вазопрессином (АВП) и его аналогами, в мочевом пузыре лягушки Rana temporaria. Было показано, что ТК оказывает тормозящее влияние на стимулированный АВП водный транспорт на этапах, предшествующих образованию цАМФ, и усиливает его на последующих этапах. В процессе регуляции стимулированного АВП водного транспорта вовлекаются по крайней мере две формы ТК с различными свойствами. Вовлечение ТК в передачу сигнала от рецепторов АВП не связано с их активацией.

Ключевые слова: водный транспорт, аргинин-вазопрессин, циклический аденозинмонофосфат, тирозинкиназы, мочевой пузырь лягушки.

ABSTRACT

The role of tyrosine proteinkinases (TPK) in the regulation of water transport stimulated by arginine vasopressin (AVP) and its analogs in the urinary bladder of frog Rana temporaria has been studied. It was shown that TPK had an inhibiting influence on the AVP-stimulated water transport at the stages preceding the formation of cAMP and increased it at the following stages. It was found that At least two forms of TPK with different properties were involved in the control of AVP-stimulated water transport. The involvement of TPK into signal transduction from AVP receptors seems to be independent of their action.

Key words: water transport, arginine vasopressin, cAMP, tyrosin kinase, frog bladder.

ВВЕДЕНИЕ

Тирозиновые протеинкиназы, или тирозинкиназы, являются важным компонентом в цепи внутриклеточных реакций, связанных с регуляцией сосудистого тонуса, клеточного роста и пролиферации клеток различного типа [9]. Все эти процессы стимулируются многими агентами, в том числе и аргинин-вазопрессином [10, 11]. В настоящее время описаны свыше 20 видов тирозинкиназ [9], которые можно условно разделить на 2 категории — рецепторные, или мембранно-связанные, и цитоплазматические формы. Первые связаны с рецепторами инсулина и многочисленных ростовых факторов, функция цитоплазматических форм известна меньше. Эти тирозинкиназы являются компонентами сложного каскада внутриклеточных реакций, в которых участвует протеинкиназа С и так называемые митоген-активируемые протеинкиназы (МАР-киназы) [6]. Один из наиболее часто употребляемых ингибиторов тирозинкиназ — генистеин — угнетает как мембранно-связанные, так и цитоплазматические формы фермента. Другой ингибитор — эрбстатин — обладает избирательным действием по отношению к рецепторным формам тирозинкиназ [20]. Вазопрессорный эффект аргинин-вазопрессина и стимулированые им рост и пролиферация гладкомышечных элементов осуществляются через рецепторы V_1, сопряженные с фосфолипазой С и вызывающие повышение содержания внутриклеточного кальция и активацию протеинкиназы С. Уже упомянутые МАР-киназы принимают участие в передаче сигнала от рецепторов вазопрессина типа V_1 [3]. Антидиуретический эффект вазопрессина реализуется через рецепторы типа V_2, сопряженные с ГТФ-связывающими белками и аденилатциклазой. Их активация приводит к увеличению содержания в клетках, чувствительных к гормону, циклического аденозинмонофосфата (цАМФ) с последующей активацией протеинкиназы А [4].

В клетках, чувствительных к аргинин-вазопрессину, обнаруживают рецепторы обоих типов. Системы проведения сигналов от рецепторов V_1 и V_2 могут взаимодействовать между собой. При этом компоненты передачи сигнала от рецепторов V_1 оказывают на передачу антидиуретического сигнала как тормозящее [2, 17], так и активирующее действие [1, 12].

Хотя вазопрессин стимулирует рост и пролиферацию клеток через рецепторы типа V_1, есть данные об участии в этих процессах, стимулированных другими агентами, цАМФ, важного компонента цепи внутриклеточных реакций, связанных с рецептором V_2 [7].

В предыдущей работе нами было показано [1], что ингибитор тирозинкиназы генистеин потенцирует действие аргинин-вазопрессина и ряда его функциональных аналогов на транспорт воды через стенку мочевого пузыря амфибий. Однако эта работа была выполнена с использованием только генистеина, который является неселективным ингибитором тирозинкиназ. Сравнение эффекта генистеина с действием ингибитора рецепторных форм тирозинкиназы эрбстатина позволило бы выяснить, какие формы фермента вовлекаются в регуляцию антидиуретического эффекта.

Прямых доказательств связи тирозинкиназ с рецепторами вазопрессина нет, хотя выше уже приводились данные, указывающие на их участие в эффектах, вызываемых стимуляцией рецепторов типа V_1. Ранее нами было обнаружено, что протеинкиназа С, известная как один из тормозных регуляторов проведения сигнала от рецепторов V_2, может выступать и в роли активатора этого сигнала [1]. Это необычное для протеинкиназы С действие наблюдается при стимуляции этого фермента со стороны апикальной мембраны мочевого пузыря амфибий. Между тем, именно на конечных этапах передачи сигнала от рецепторов аргинин-вазопрессина, т. е. вблизи апикальной мембраны, обнаружено синергическое взаимодействие протеинкиназы С и тирозинкиназы [3].

Известно, что агонист пуринорецепторов P_1 аденозин-5'-трифосфат (АТФ) обладает как сильным митогенным свойством [8], так и способностью подавлять антидиуретический эффект вазопрессина [15]. Однако данных об участии тирозинкиназ в многочисленных эффектах АТФ нет.

В связи с изложенными фактами, нам казалось интересным исследовать: 1) участие тирозинкиназ в проведении сигнала от рецепторов V_2; 2) роль тирозинкиназ во взаимодействии сигнальных систем, связанных с рецепторами V_1 и V_2 аргинин-вазопрессина; 3) участие и роль тирозинкиназы в подавлении антидиуретического эффекта аргинин-вазопрессина аденозин-5'-трифосфатом.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследование было проведено на мочевых пузырях лягушки Rana temporaria L., выделенных по методу Bentley [5]. Опыты проводились в осенне-зимнее время, когда получаются наиболее стабильные результаты. Для обездвиживания животных разрушали головной и спинной мозг. Во время препаровки мочевые пузыри лягушек, являющиеся аналогом дистального сегмента нефрона млекопитающих, разделяли на две половины, которые заполняли разведенным в 5 раз раствором Рингера для холоднокровных следующего состава (мМ): Na^+ 112; K^+ 5,6; Ca^{++} 0,89; Cl^- 113; $H_2PO_4^-$ 0,6; HPO_4^+ 2,4; pH 7,3; 220 мосм. Осмотический градиент между инкубационной средой и внутренним содержимым пузыря составлял 176 мосм/л. Оценку водного потока по осмотическому градиенту производили гравиметрическим методом и выражали в мкл/см^2 стенки пузыря. В процессе работы одна половинка пузыря служила контролем для другой. Для стимуляции водного потока использовали аргинин-вазопрессин (Sigma), селективный активатор рецепторов V_2 — десмопрессин (Spofa-Praga), активатор аденилатциклазы форсколин, вторичный посредник вазопрессина циклический аденозинмонофосфат фирмы Sigma. Для стимуляции водного потока применяли тжже метод осмотической гипертонизации наружной среды (300 мосм маннита), воспроизводящий внутриклеточные эффекты вазопрессина [14]. Использовали также ингибиторы тирозинкиназ генистеин и эрбстатин (RBI), активатор протеинкиназы С PMA и ее ингибитор стауроспорин фирмы Sigma, агонист пуриновых рецепторов P_2 аденозин-5'-трифосфат (RBI). Все эти препараты, кроме PMA, добавляли в наружную среду, PMA вводили в просвет пузыря.

Результаты экспериментов обрабатывали с помощью парного и непарного критериев Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Как видно из рис. 1, генистеин (10 мкм) оказывал выраженное потенцирующее действие на гидроосмотический эффект вазопрессина, десмопрессина, форсколина и гиперосмолярности наружной среды. Однако в тех же концентрациях генистеин снижал величину осмотического водного потока, стимулированного цАМФ. Этот эффект генистеина наблюдался как при pH 7,3, так и при его повышении до 8,0 (рис. 2). В от-

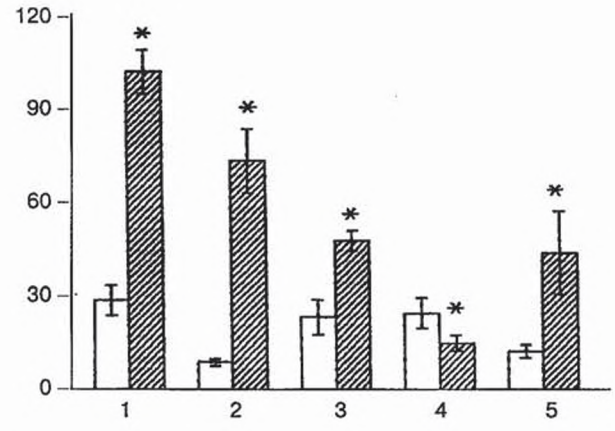

Рис. 1. Влияние генистеина на стимулированный различными агентами водный транспорт в мочевом пузыре лягушки.

По оси абсцисс — стимуляторы потока: 1 — аргинин-вазопрессин, 0,5 мкмоль; 2 — десмопрессин, 1 мкмоль; 3 — форсколин, 50 мкмоль; 4 — цАМФ, 80 мкмоль; 5 — маннит, 300 ммоль. Светлые столбики — контроль: стимулятор потока; заштрихованные столбики — опыт: стимулятор потока на фоне генистеина (10 мкмоль); по оси ординат — поток воды, мкл/см^2 за 60 мин; n — 6—8; звездочка — p<0,02 (парный критерий Стьюдента).

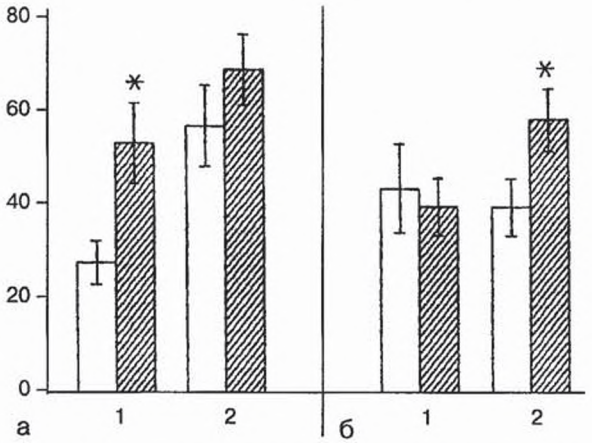

Рис. 2. Влияние ингибиторов тирозинкиназы генистеина (а) и эрбстатина (б) на стимулированный аргинин-вазопрессином (0,5 мкмоль) водный транспорт при различных значения pH наружного раствора среды инкубации.

По оси абсцисс — светлые столбики — контроль: аргинин-вазопрессин; заштрихованные столбики — опыт: аргинин-вазопрессин на фоне ингибиторов тирозинкиназы: 1 — при pH 7,3; 2 — при pH 8,0; n — 6—8; звездочка — p<0,05 (парный критерий Стьюдента); по оси ординат — поток воды, мкл/см^2 за 60 мин.

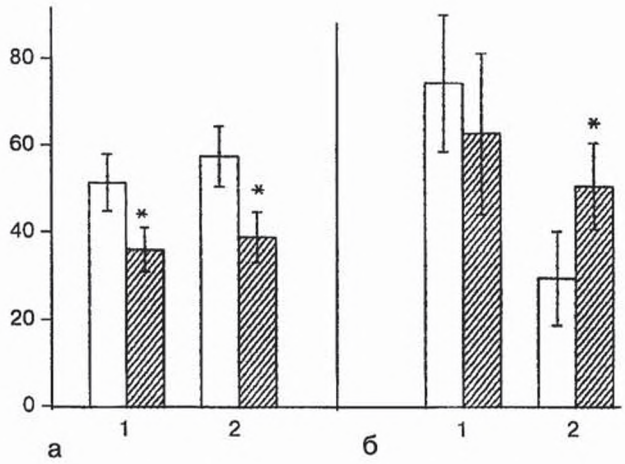

Рис. 3. Влияние ингибиторов тирозинкиназы генистеина (а) и эрбстатина (б) на стимулированный цАМФ (80 мкмоль) водный транспорт при различных значениях pH наружного раствора среды инкубации.

По оси абсцисс— светлые столбики — контроль: цАМФ; заштрихованные столбики — опыт: цАМФ на фоне ингибиторов тирозинкиназы: 1 — при pH 7,3; 2 — при pH 8,0; n — 6—8; звездочка — p<0,05 (парный критерий Стьюдента); по оси ординат — поток воды, мкл/см^2 за 60 мин.

личие от генистеина, эрбстатин в той же концентрации потенцировал эффект вазопрессина только при pH 8,0. При этих же значениях pH эрбстатин не только не угнетал гидроосмотическое действие цАМФ, но, в противоположность генистеину, потенцировал его (рис. 3). Таким образом, эрбстатин — препарат, угнетающий только рецепторные формы тирозинкиназ, оказывает на эффект вазопрессина и особенно цАМФ действие, резко отличное от действия генистеина. Можно предполагать, что усиливающее влияние на передачу сигнала на этапах, следующих за образованием цАМФ, оказывает цитоплазматическая форма тирозинкиназы.

Следующая серия опытов была посвящена исследованию роли тирозинкиназы в потенцирующем влиянии протеинкиназы С на водный поток, стимулированный вазопрессином. Как видно из рис. 4, введение активатора протеинкиназы С PMA в просвет мочевого пузыря усиливает гидроосмотический эффект вазопрессина. В присутствии же генистеина влияние PMA становится ингибирующим. Следовательно, тирозинкиназа каким-то образом участвует в реализации активирующего действия протеинкиназы С на проведение антидиуретического сигнала от рецепторов вазопрессина.

Наконец, заключительным этапом работы было исследование роли тирозинкиназ в подавлении гидроосмотического эффекта вазопрессина, вызываемого АТФ. Как видно из рис. 5, генистеин достоверно снижает степень угнетения антидиуретического эффекта, вызванного АТФ (50 ммоль). Ингибитор же протеинкиназы С стауроспорин полностью восстанавливает эффект вазопрессина.

ОБСУЖДЕНИЕ

Итак, согласно результатам нашей работы, ингибитор тирозинкиназ генистеин в значительной степени усиливает эффект всех воздействий, вызывающих повышение проницаемости апикальной мембраны и водный поток по осмотическому градиенту за исключением цАМФ. Это указывает на существование негативного контроля передачи сигнала от рецепто-

ров вазопрессина со стороны тирозинкиназ. Осмотический поток, стимулированный цАМФ, в присутствии генистеина снижается. Таким образом, на этапах передачи сигнала от рецепторов вазопрессина, следующих после образования цАМФ, негативный контроль со стороны тирозинкиназы сменяется позитивным. Механизм и локализация потенцирующего действия тирозинкиназы на эффект цАМФ не ясен. Однако отсутствие ингибирующего действия на гидроосмотический эффект цАМФ у эрбстатина позволяет заключить, что позитивный контроль передачи сигнала от цАМФ осуществляет не рецепторная, а цитоплазматическая форма тирозинкиназы. В негативном же контроле передачи сигнала на этапах, предшествующих образованию цАМФ, участвуют обе формы фермента, имеющие различную pH-зависимость. Полученные нами данные об активирующем действии тирозинкиназы на этапах передачи антидиуретического сигнала, следующих за образованием цАМФ, согласуются с фактом участия тирозинкиназы в усилении антидиуретического эффекта аргинин-вазопрессина при добавлении активатора протеинкиназы С с мукозной стороны пузыря, т. е. вблизи апикальной мембраны. Этот эффект протеинкиназы С нуждается в дополнительном разъяснении. Общепринято, что этот фермент оказывает тормозящее действие на передачу сигнала от «антидиуретических» рецепторов вазопрессина — V_2 [4]. Но, как выяснилось, эти выводы относятся только к результатам воздействия на протеинкиназу С со стороны базальной мембраны. Если же агенты, модулирующие активность протеинкиназы, добавляются к мукозной поверхности мочевого пузыря, т. е. со стороны апикальной мембраны, то можно обнаружить усиливающее влияние протеинкиназы С на водный транспорт, стимулированный вазопрессином [1, 12]. Обнаруженное нами участие в этом процессе тирозинкиназы согласуется с результатами исследования [3], согласно которому, в области апикальной мембраны тирозинкиназа и протеинкиназа С действуют в едином ансамбле.

Чем же активируется тирозинкиназа при различных способах стимуляции водного потока? Есть данные об участии тирозинкиназы в эффектах, осуществляемых при активации рецепторов типа V_1, но роль этих рецепторов мы можем исключить, так как генистеин потенцирует и эффект селективного агониста рецепторов V_2 — десмопрессина. Вообще роль рецепторов аргинин-вазопрессина в активации тирозинкиназы мы можем подвергнуть серьезному сомнению, так как ее угнетение генистеином вызывает рост гидроосмотических эффектов форсколина и осмотической гипертонии, вызванной маннитом, в которых рецепторы не участвуют. Со времени нашей первой статьи, где мы предположили осмотическую природу активации тирозинкиназ, появились серьезные доказательства такой возможности [18]. Понижающая объемная регуляция, в которой участвует тирозинкиназа [18], возникает в клетках, чувствительных к вазопрессину после повышения проницаемости апикальной мембраны и входа воды в клетки.

Исследование роли тирозинкиназы в ингибирующем действии АТФ на стимулированный вазопрессином водный поток не только раскрывает, по крайней мере, частично механизмы этого действия, но лишний раз подчеркивает однонаправленность эффектов тирозинкиназы и протеинкиназы С.

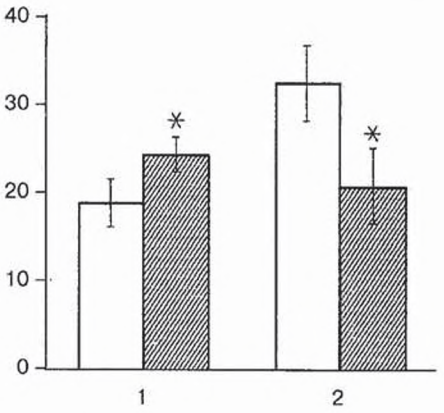

Рис. 4. Влияние генистеина на потенцирование активатором протеинкиназы С (PMA) стимулированного аргинин-вазопрессином (0,5 мкмоль) водного транспорта в мочевом пузыре лягушки.

По оси абсцисс — 1 — светлый столбик — контроль: аргинин-вазопрессин; заштрихованный столбк — опыт: аргинин-вазопрессин на фоне PMA в мукозном растворе (50 нмоль); 2 — светлый столбик — контроль: аргинин-вазопрессин на фоне генистеина (10 мкмоль); заштрихованный столбик — опыт: аргинин-вазопрессин на фоне генистеина (10 мкмоль) в серозном и PMA в мукозном растворе (50 нмоль). n — 6—8; звездочка — $p<0,05$ (парный критерий Стьюдента); по оси ординат — поток воды, мкл/см^2 за 60 мин.

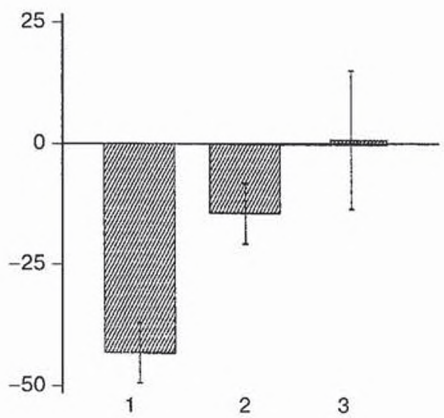

Рис. 5. Влияние генистеина и стауроспорина на торможение аденозинтрифосфатом (АТФ) стимулированного аргинин-вазопрессином (0,5 мкмоль) водного транспорта в мочевом пузыре лягушки.

По оси абсцисс — аргинин-вазопрессин (0,5 мкмоль) на фоне: 1 — АТФ (50 мкмоль); 2 — генистеина (10 мкмоль) и АТФ (50 мкмоль); 3 — стауроспорина (10 нмоль) и АТФ (50 мкмоль); по оси ординат — изменения водного транспорта (%) по отношению к контрольному уровню, который соответствует эффекту 0,5 мкмоль аргинин-вазопрессина (0 на оси ординат).

Наиболее интригующие результаты работы касаются факта стимулирующего влияния тирозинкиназы и протеинкиназы С на конечные этапы передачи сигнала

от рецепторов вазопрессина. Исследованию механизмов этого явления будут посвящены наши дальнейшие исследования, поскольку конечная часть передачи сигнала от рецепторов типа V_2 между образованием цАМФ и встраиванием водных каналов остается наименее изученной.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучение роли тирозинкиназ в физиологии и патологии почек и водно-солевого обмена может позволить уточнить не только механизмы антидиуреза, но и другие стороны действия аргинин-вазопрессина. Принимая участие в каскаде клеточных реакций, стимулирующих пролиферацию мезангия, тирозинкиназы могут быть существенным компонентом прогрессирования сосудистых и воспалительных заболеваний почек [21]. С другой стороны, тирозинкиназа при тяжелом ишемическом повреждении участвует в процессах регенерации [19]. Не исключено, что прямое участие аргинин-вазопрессина как в прессорной реакции, так и в гипертрофии и гиперплазии сосудистых гладких мышц, опосредованное через тирозинкиназу, может объяснить давно описанную, но до сих пор непонятную роль этого гормона в развитии злокачественной гипертонии [13]. Избирательное фармакологическое воздействие на активность тирозинкиназ может позволить не только замедлить опухолевый рост и развитие нефросклероза, но и стимулировать процессы регенерации при острой патологии почек.

ЛИТЕРАТУРА

1. Багров Я.Ю., Дмитриева Н.И., Манусова Н.Б. О роли протеинкиназы С и мускариновых холинорецепторов в стимулированном вазопрессином водном транспорте // Экспер. клин. фармакол.—1995.—Т. 58, № 4.—С. 33—35.

2. Наточин Ю.В., Парнова Р.Г., Фирсов Д.Л., Шахматова Е.И. Внутриклеточные сигнальные системы в механизме антидиуретического действия вазопрессина // Биол. мембраны.—1991.—Т. 8.—С. 1215—1216.

3. Aharanovitz O., Granot Y. Stimulation of mitogen-activated protein kinase and Na^+/H^+ exchanger in human platelets differntial effect of phorbol ester and vasopressin // JBC.—1996.—Vol. 271, № 28.—P. 16494—16499.

4. Ausiello D.A., Scorecki K.L., Verkman A.S., Bonventre J.V. Vasopressin signaling in kidney cells // Kidney Int.—1986.—Vol. 31.—P. 511—529.

5. Bentley P.J. The effects of neurohypophyseal extracts on the water transfer across the wall of isolated urinary bladder of the toad Bufo marinus // J. Endocrinol.—1958.—Vol. 17.—P. 201—204.

6. Boremeyer D., Sorokin A., Dunn M. Multiple intracellular MAP kinase signaling cascade // Kidney Int.—1996.—Vol. 49, № 5.—P. 1187—1198.

7. Dumont J.E., Janiaux J.C., Roger P.P. The cyclic AMP-mediated stimulation of cell proliferation // TIPS.—1989.—Vol. 14.—P. 67—71.

8. Erlinge D., Yoo H., Edvinsson L., Reis D.J., Wahlestedt C. Mitogenic effects of ATP on vascular smooth muscle cells vs. other growth factors and sympathetic cotransmitters // Amer. J. Physiol.—1993.—Vol. 265.—P. H1089—H11097.

9. Hanks S.K., Hunter T. Protein kinase 6: the eucariotic protein kinase superfamily: kinase catalytic domain structure and classification // FASEB J.—1995.—Vol. 9, № 8.—P. 576—596.

10. Kaplan N., DiSalvo J. Coupling between [arginige 8]-vasopressin-activated increases in protein tyrosine phosphorylation and cellular calcium in A7r5 aortic smooth muscle cells // Arch. Biochem. Biophys.—1996.—Vol. 328, № 2.—P. 271—280.

11. Laniyonu A.A., Saifeddine M., Yang S-G., Hollenberg M.D. Tyrosine kinase inhibitors and the contractile action of G-protein-linked vascular agonists // Can. J. Physiol.—1994.—Vol. 472, № 9.—P. 1075—1085.

12. Masur S.K., Massardo S. ADH and phorbol ester increase immunolabeling of the toad bladder apical membrane by antibodies made to granules // J. Membr. Biol.—1987.—Vol. 96.—P. 193—198.

13. Mohring Y., Mohring B., Petri M., Haack D. Vasopressor role of ADH in the pathogenesis of malignant dog hypertension // Amer. J. Physiol.—1977.—Vol. 232.—P. F260—F269.

14. Ripoche P., Bourguet J., Parisi M. The effect of hypertonic media on water permeability of frog urinary bladder. Inhibition by catecholamines and prostaglandin E2 // J. Gen. Physiol.—1973.—Vol. 51, № 1.—P. 110—125.

15. Rouse D., Leite M., Suki W.N. ATP inhibits the hydrosmotic effect of AVP in rabbit CCN: evidence for a nucleotide P_2 receptor // Amer. J. Physiol.—1994.—Vol. 267, № 2.—P. F289—F295.

16. Rozengurt E. Early signals in the mitogenic response // Science.—1986.—Vol. 234.—P. 161—166.

17. Schlondorff D. Interactions of vasopressin with calmoduline and protein kinase C in Vasopressin, ed. by Schrier R.V.—Raven press, New York: 1985.—P. 113—123.

15. Tilly B.C., van den Berghe N., Tertoolen L.G.I. et al. Protein tyrosine phosphorylation is involed in osmoregulation of ionic conductances // JBC.—1993.—Vol. 268, № 27.—P. 19910—19922.

19. Tsao T., Hsu F.W., Rabkin R. IGF-1 receptor binding, autophosphorylation, and activity in kidney and muscle of acutely uremic rats // Amer. J. Physiol.—1997.—Vol. 272, № 3.—P. F325—F332.

20. Tsunoda Y., Modlin I.M., Goldenberg J.R. Tyrosine kinase activities in the modulation of stimulated parietal cell acid secretion // Amer. J. Physiol.—1993.—Vol. 264.—P. G351—G356.

21. Wolf G., Neilson E.G. Molecular mechanisms of tubulointerstitial hypertrophy and hyperplasia // Kidney Int.—1991.—Vol. 39, № 3.—P. 401—420.