

*Терпинская Т.И.¹, Янченко Т.Л.¹, Полукошко Е.Ф.¹, Радченко А.В.²,
Грибовская В.А.², Артемьев М.В.²*

Участие протеинкиназ в поглощении клетками флуоресцентных наночастиц с полимерной оболочкой

¹ГНУ «Институт физиологии Национальной академии наук Беларуси»,
Минск, Республика Беларусь

²НИИ Физико-химических проблем Белорусского государственного
университета, Минск, Республика Беларусь

Протеинкиназы представляют собой группу ферментов, осуществляющих фосфорилирование белков, что приводит к изменению функциональной активности последних. Фосфорилируемые белки часто сами являются ферментами, участвуют в передаче биохимических сигналов и регулируют важнейшие процессы клеточного метаболизма. К таким процессам, в числе других, относится эндоцитоз – поглощение клеткой различных веществ посредством образования мембранных везикул. Таким путем клетка поглощает не только рецепторы и их лиганды, но также многие вирусы и искусственные наночастицы. Применение флуоресцентных наночастиц позволяет, используя проточную цитофотометрию, количественно оценить интенсивность эндоцитоза при воздействии различных факторов и исследовать молекулярные механизмы интернализации.

Целью нашей работы было исследовать участие протеинкиназ в процессах поглощения флуоресцентных наночастиц, покрытых оболочкой из производных амфифильного полимера.

Материалы и методы. Опыты проведены на клетках глиомы С6. В экспериментах использованы два типа флуоресцентных полупроводниковых наночастиц CdSe/ZnS, покрытых полимерной оболочкой, включающей положительно заряженные четвертичные аммонийные группы и отрицательно заряженные карбоксильные (наночастицы типа 1) или сульфонатные (наночастицы типа 2) группы. Дзета-потенциал наночастиц составлял +7,8 и +10,3 мВ соответственно.

При проведении экспериментов клетки отмывали от среды культивирования и ресуспензировали в фосфатном буфере. В клеточные пробы вносили ингибиторы протеинкиназ - генестеин в дозе 100 мкМ, хлорпромазин в дозе 56 мкМ и стауроспорин в дозах 0,01; 0,4; 1 и 4 мкМ, в контрольных сериях – изотонический раствор. Инкубировали 30 мин при 37°C и 5% CO₂ 30 мин и затем добавляли наночастицы в конечной концентрации 0,02 мкМ. Еще через 30 мин инкубации в тех же условиях оценивали интенсивность флуоресцентной маркировки клеток, анализируя пробы с использованием проточного цитофлуориметра BD FACSCanto II.

Результаты. Генестеин (ингибитор тирозинкиназ) и хлорпромазин (ингибитор кальмодулина и кальмодулин-зависимых протеинкиназ) на треть снижали маркировку клеток наночастицами типа 1. Это свидетельствует в пользу участия тирозинкиназ и кальмодулин-зависимых протеинкиназ в эндоцитозе данных наночастиц. Также наблюдалось снижение на 15 – 26% маркировки клеток, обработанных стауроспорином в дозах 0,01 и 0,4 мкМ, но не в дозах 1 и 4 мкМ. Стауроспорин является неселективным ингибитором протеинкиназ, в наномолярных дозах он ингибирует протеинкиназы С (PKC) α , γ , η , δ и ϵ , в более высоких – протеинкиназу C ζ , а также такие киназы, как PKA, PKG, S6K, CaMKII и другие. Вероятно, что существенное значение для поглощения наночастиц имеют протеинкиназы С, за исключением подтипа ϵ . Можно также предположить, что определенные киназы подавляют процессы эндоцитоза. Активность этих киназ ингибируется микромолярными дозами стауроспорина, что способствует поглощению наночастиц даже при подавлении PKC. Применение высокоселективных ингибиторов протеинкиназ позволит более точно определить ферменты, которые способствуют, либо, наоборот, препятствуют эндоцитозу. При использовании поглощения наночастиц типа 2 наблюдались сходные, хотя и менее выраженные тенденции – стауроспорин в дозах

0,01 и 0,4 мкМ, а также хлорпромазин и генестеин способствовали снижению флуоресцентной маркировки клеток на 16 – 32%.

Заключение. Протеинкиназы участвуют в регулировании процессов эндоцитоза наночастиц. Поглощению положительно заряженных наночастиц клетками глиомы С6, инкубируемыми в фосфатном буфере, способствуют ферменты, относящиеся к тирозинкиназам, кальмодулин-зависимым протеинкиназам и, вероятно, протеинкиназам С.

Работа выполнена при поддержке задания ГПНИ 2.1.04 и гранта БРФФИ Х20М-031.