

О ВЛИЯНИИ α -ТОКОФЕРОЛА НА АКТИВНОСТЬ ПРОТЕИНКИНАЗЫ С *in vitro*

© 2015 г. Н.Е. Крассова, С.В. Уграйская, Н.В. Пеньков, Е.Е. Фесенко (мл.)

Институт биофизики клетки РАН, 142290, Пущино Московской области, ул. Институтская, 3

E-mail: eugeny.ef@gmail.com

Поступила в редакцию 23.07.15 г.

Изучено влияние антиоксиданта α -токоферола на активность протеинкиназы С, выделенной из мозга крысы, как модельной системы для исследования бимодальной дозовой зависимости. Для измерения активности фермента применен фотометрический метод на основе люциферазной реакции с определением количества АДФ, образовавшегося в ходе реакции фосфорилирования. Исследование действия α -токоферола на активность протеинкиназы С *in vitro* выявило ингибирующий эффект препарата в диапазоне концентраций 10^{-3} – 10^{-6} М, но не подтвердило наличие второго максимума биоэффекта при применении сверхмалых доз α -токоферола (10^{-12} М и ниже), что может быть связано с природой источника выделяемого фермента.

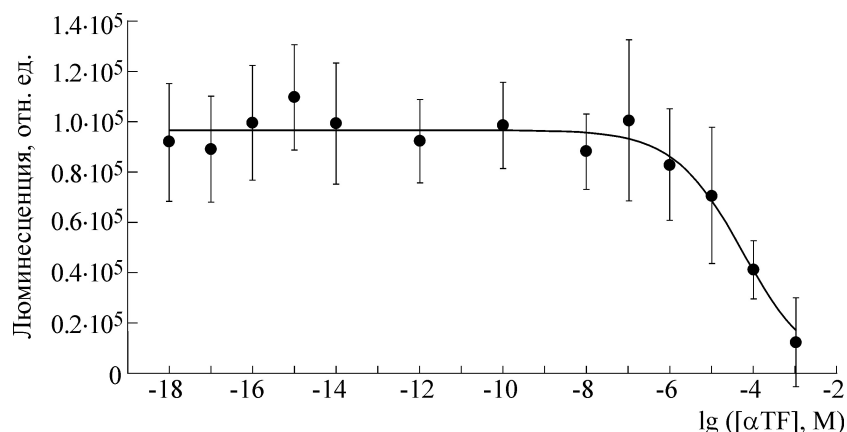
Ключевые слова: протеинкиназа С, α -токоферол, ингибитор, сверхмалые дозы, фотометрия, люциферазная реакция.

При изучении эффектов ряда биологически активных веществ было показано, что дозовая зависимость может иметь сложный характер: эффект, наблюдаемый в «обычном» концентрационном диапазоне действия вещества 10^{-3} – 10^{-7} М, сменяется «мертвой зоной», после чего вновь проявляется в области сверхмалых доз препарата (10^{-12} М и ниже). Дозовые зависимости такого типа получили название бимодальных. Бимодальные дозовые кривые описаны для значительного числа соединений [1]. Предложено несколько гипотез, объясняющих механизм действия сверхмалых доз препаратов, в том числе параметрического резонанса [2], взаимодействия каталитических центров в молекуле фермента [3], влияния градиента концентраций [4], наличия систем усиления сигнала [5]. Одна из гипотез связывает действие сверхмалых доз на биологический объект с изменением структурных свойств водного раствора [1,6]. В цикле работ, выполненных под руководством академика А.И. Коновалова, было установлено, что в высокоразбавленных водных растворах различных веществ наблюдается изменение комплекса физико-химических свойств, объясняемое возникновением стабильных супрамолекулярных структур – наноассоциатов [7–9]. При этом было показано, что наноассоциаты не образуются в «нулевом» магнитном поле [10]. Высказано предположение, что образование подобных супрамолекулярных структур может лежать в основе механизма бимодальной дозовой

зависимости [11]. Для того чтобы приблизиться к пониманию основ данного феномена, требуется разработать высоковоспроизводимые биомодели с надежной регистрацией биоэффекта в области второго максимума. Такая модель в последующем позволила бы проводить исследование физико-химических свойств водных растворов действующих доз биологически активного вещества.

Задачей данной работы являлась разработка максимально стандартизованной биологической модели с бимодальным характером дозовой зависимости на основе системы изолированный фермент–эффектор. С этой целью была выбрана система протеинкиназа С– α -токоферол, описанная в работе [12], со вторым максимумом биоэффекта – ингибирования протеинкиназы С – в области концентраций α -токоферола 10^{-15} М.

В экспериментальной работе использовали протеинкиназу С, выделенную из мозга крысы и очищенную по методу Вальтона [13], а также синтетический α -токоферол (кат. № Т3251, чистота > 96%, Sigma, США). Очищенная протеинкиназа С состояла преимущественно из α -, β - и γ -изоформ с незначительными примесями δ - и ζ -изоформ фермента. Протеинкиназа С и другие необходимые компоненты ферментативной реакции (пептидный субстрат, активатор фермента, буфер) входили в состав коммерческого набора РКС Kinase Enzyme System (кат.



Зависимость интенсивности люминесценции от концентрации ингибитора α -токоферола, добавленного в ферментативную реакцию протеинкиназы С. Интенсивность люминесценции пропорциональна количеству АДФ, образовавшемуся в ходе ферментативной реакции и служащему индикатором активности протеинкиназы С. На графике отмечены средние значения и стандартное отклонение, $n = 5-15$. Контроли не приведены.

№ V4504, Promega, США). Навеску α -токоферола растворяли в этиловом спирте с получением 0,1 М исходного раствора. Далее растворы α -токоферола готовили методом последовательного разбавления в 10 раз исходного раствора свежеприготовленной бидистиллированной водой с последующим встряхиванием на шейкере в течение 1 мин. В отдельных экспериментах при каждом разведении раствор α -токоферола дополнительно инкубировали 24 ч в закрытом суховоздушном термостате при 20°C перед последующим разбавлением. Для измерения активности фермента использовали коммерческий набор для фотометрического определения количества АДФ, образовавшегося в ходе реакции фосфорилирования (на основе использования люциферазной реакции) (кат. № V9101, ADP-Glo™ Kinase Assay, Promega, США). Реакцию фосфорилирования и последующее детектирование активности протеинкиназы С проводили в соответствии с рекомендованными протоколами производителя. Фотометрию проводили на планшетном люцинометре GloMax® 96 Microplate Luminometer (Promega, США). При проведении экспериментов ставили множественные контроли (положительный контроль без α -токоферола, контроли на люминесценцию отдельных компонентов реакции, а также растворов этилового спирта (растворителя α -токоферола) в различных разведениях вместо ингибитора).

Проведенное исследование действия α -токоферола на активность выделенной протеинкиназы С *in vitro* в диапазоне концентраций 10^{-3} – 10^{-18} М выявило ингибирующий эффект препарата в области 10^{-3} – 10^{-6} М (рисунок). Активность протеинкиназы С увеличивалась по мере снижения концентрации α -токоферола с 10^{-3} до

10^{-6} М, выходя затем на плато, соответствующее контрольному уровню активности фермента в отсутствие ингибитора. Полученные результаты подтверждают данные о том, что α -токоферол способен напрямую ингибировать протеинкиназу С, связываясь с одним из каталитических доменов фермента [12,14]. До недавнего времени ряд исследователей придерживались мнения, что α -токоферол опосредованно ингибирует протеинкиназу С, реализуя свое влияние на клеточном уровне через активацию фосфатазы PP_2A [15,16].

В данной работе нам не удалось подтвердить наличие второго максимума биоэффекта при применении сверхмалых доз α -токоферола 10^{-14} – 10^{-15} М. Можно предположить, что расхождение полученных результатов с данными работы [12] обусловлено более высокой степенью очистки используемого нами фермента и отсутствием в системе фермент–эффектор неучтенных факторов, обеспечивающих каскадный механизм усиления сигнала и, соответственно, второй максимум биоэффекта.

Вторая причина расхождений может быть связана с различием объектов, из которых выделяли фермент. В базовой работе авторы использовали протеинкиназу С из сердца кролика, которую выделяли сами. Согласно литературным данным в сердце кролика содержатся 10 индивидуальных изоферментов: α , β_1 , β_2 , γ , δ , ϵ , ζ , η , θ , λ , μ [17]. Каждая из этих изоформ могла вносить свой вклад в общую активность протеинкиназы С. В описываемой же работе протеинкиназа С, выделенная из мозга крысы, содержала только пять изоформ с преобладанием α , β и γ и незначительной добавкой δ и

ζ. Следует отметить, что в протеинкиназе С, выделенной из сердца кролика, изоформы ε и ζ не являются минорными и играют существенную роль в функционировании сердечной мышцы. Таким образом, отсутствие второго максимума биоэффекта может быть обусловлено иным составом исследуемого фермента.

Прорыв в изучении эффектов сверхмалых доз вероятнее всего возможен при объединении двух научных направлений – физики водных растворов и биологии функционирования относительно простых и воспроизводимых биологических систем. Поиск таких систем будет продолжен.

Авторы благодарят проф. Н.П. Пальмину за ценные комментарии, сделанные при обсуждении результатов работы.

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы Президиума РАН № 28 «Проблемы происхождения жизни и становления биосферы» (подпрограмма I, направление «Физика, химия и биология воды»).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Е. Б. Бурлакова, А. А. Конрадов и Е. Л. Мальцева, Хим. физика **22** (2), 390 (2003).
2. А. Л. Блюменфельд, Биофизика **1**, 129 (1993)
3. Е. Б. Бурлакова, А. А. Конрадов и И. В. Худяков, Изв. АН СССР. Сер. биол. **2**, 184 (1990)
4. С. В. Зайцев, А. М. Ефанов и Л. А. Сазанов, Рос. хим. журн. **XLIII** (5), 28 (1999)
5. И. П. Ашмарин, Е. П. Каразеева и Т. В. Лелекова, Рос. хим. журн. **XLIII** (5), 21 (1999)
6. Н. П. Пальмина, В. В. Белов, В. Е. Жерновков и Е. Л. Мальцева, в кн.: *Состояние воды в биологических и модельных системах* (Тверь, 2007).
7. И. С. Рыжкина, Л. И. Муртазина, Ю. В. Киселева и А. И. Коновалов, Докл. РАН **428** (4), 487 (2009).
8. И. С. Рыжкина, Ю. В. Киселева, Л. И. Муртазина и др., Докл. РАН **447** (2), 179 (2012).
9. И. С. Рыжкина, Ю. В. Киселева, А. П. Тимошева и др., Докл. РАН **447** (1), 56 (2012).
10. И. С. Рыжкина, Л. И. Муртазина и А. И. Коновалов, Докл. РАН **440** (6), 778 (2011).
11. Н. П. Пальмина, Т. Е. Часовская, И. С. Рыжкина и др., Докл. РАН **429** (1), 128 (2009).
12. Н. П. Пальмина, Е. Л. Мальцева, Н. В. Курнакова и Е. Б. Бурлакова, Биохимия **59**, 193 (1994).
13. G. M. Walton, H. Bertics, P. J. Hudson, et al., Anal. Biochem. **161**, 425 (1987).
14. C. A. McCary, Y. Yoon, C. Panagabko, et al., Biochem. J. **441**, 189 (2012).
15. R. Ricciarelli, A. Tasinato, S. Clement, et al., Biochem. J. **334**, 243 (1998).
16. A. Azzi and J. M. Zingg, Biochem. Mol. Biol. Educ. **33** (3), 184 (2005).
17. P. Ping, H. Takano, J. Zhang, et al., Circ Res. **84** (5), 587 (1999).

On the Effect of α-Tocopherol on Protein Kinase C Activity *in vitro*

N.E. Krassova, S.V. Ugraitkaya, N.V. Penkov, and E.E. Fesenko Jr.

*Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences,
ul. Institutskaya 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

The effect of the antioxidant α-tocopherol on rat brain protein kinase C activity as a model to study bimodal dose-dependent effect has been investigated. Enzyme activity has been monitored photometrically with a luciferase reporter assay that measures ADP produced by phosphorylation. The inhibition of protein kinase C activity by α-tocopherol was found at the concentration range from 10^{-3} to 10^{-6} M with no effect of ultra low doses of the antioxidant (below 10^{-12} M). The absence of bimodal dose-dependent effect may be associated with the enzyme source.

Key words: protein kinase C, α-tocopherol, inhibitor, ultra low doses, photometric method, luciferase reaction