

ДОЛГОВРЕМЕННАЯ РЕГУЛЯЦИЯ Na^+, K^+ -НАСОСА В ЛИМФОЦИТАХ ЧЕЛОВЕКА: РОЛЬ JAK/STAT- И MAP-КИНАЗНЫХ СИГНАЛЬНЫХ ПУТЕЙ

© И. А. Карицкая, Н. Д. Аксенов, И. О. Васильева, Е. Г. Стрелкова, И. И. Марахова¹

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;

¹ *электронный адрес: iim@mail.cytspb.rssi.ru*

Проведено исследование транспортной активности Na^+, K^+ -АТФазного насоса (оценка убаин-чувствительных потоков рубидия), экспрессии Na^+, K^+ -АТФазы на уровне белка (метод иммуноблотинга) и мРНК (метод RT-PCR), а также уровня фосфорилирования транскрипционных факторов STAT5 и STAT3 и тирозинкиназы ERK1/2 в лимфоцитах человека, стимулированных интерлейкином-2 (ИЛ-2). Обнаружено, что в компетентных лимфоцитах ИЛ-2 за 24 ч увеличивает в 2.5—4.0 раза общее содержание $\alpha 1$ мРНК и $\beta 1$ мРНК Na^+, K^+ -АТФазы. Показано, что ингибиторы тирозинкиназы JAK3 (В-42 и WHI-P131) снижают индуцированное ИЛ-2 повышение содержания фосфорилированных форм STAT5 и STAT3 и одновременно подавляют характерное для пререпликативной стадии пролиферативного ответа нарастание входа рубидия в клетку и увеличение экспрессии каталитической $\alpha 1$ -субъединицы Na^+, K^+ -АТФазы. При подавлении активности ERK1/2, индуцированной ИЛ-2, в присутствии ингибитора MAP-киназного каскада PD98059 нарастание входного потока рубидия отсутствует, а увеличение содержания белка $\alpha 1$ Na^+, K^+ -АТФазы снижается. Все испытанные ингибиторы не влияют на внутриклеточное содержание моновалентных катионов в покоящихся и стимулированных ИЛ-2 лимфоцитах. Сделан вывод о том, что связанное с ИЛ-2-зависимой стадией пролиферативного ответа долговременное повышение транспортной активности натриевого насоса, в основе которого лежит синтез новых субъединиц Na^+, K^+ -АТФазы, контролируется через JAK/STAT- и ERK1/2-MAP-киназные пути внутриклеточной сигнализации.

Ключевые слова: Na^+, K^+ -насос, Na^+, K^+ -АТФаза, тирозинкиназа JAK3, транскрипционные факторы STAT5 и STAT3, тирозинкиназа ERK1/2, интерлейкин-2, пролиферативный ответ, лимфоциты человека.

Принятые сокращения: ИЛ-2 — интерлейкин-2, ФГА — фитогемагглютинин, ERK1/2 — extracellular signal-regulated kinase 1 and 2, JAK — Janus kinase, MAP-киназа — митогенактивируемая протеинкиназа, STAT — signal transducers and activation of transcription.

Действие ростовых факторов и запуск клеточной пролиферации сопровождаются активацией ионотранспортирующих систем плазматической мембраны, а изменения внутриклеточной концентрации ионов кальция, натрия и pH цитозоля являются компонентами раннего ответа клеток на митогенный сигнал (Kaplan, Owens, 1978; Mooleenaar et al., 1981; Rozengurt, 1981; Веренинов, Марахова, 1986; Grinstein, Dixon, 1989). Известно, что выключение отдельных систем ионного транспорта специфическими ингибиторами обратимо останавливает запуск пролиферативного ответа в клетках разного типа (Dornand et al., 1986; Szamel et al., 1995; Orlov et al., 2001). На основе большого экспериментального материала сложилось представление о том, что изменение ионного состава внутриклеточной среды играет существенную роль в регуляции размножения клеток.

Многими исследованиями установлено, что транспортная активность Na^+, K^+ -насоса, который играет ключевую роль в поддержании внутриклеточного ионного гомеостаза и осмотического баланса клеток животных, изменяется при действии гормонов, ростовых и стрессовых факторов. Являясь компонентом системы жизнеобеспе-

чения клетки, натриевый насос находится под контролем регуляторных механизмов разного типа, которые обеспечивают как быстрое, так и долговременное изменение интенсивности ионных потоков через плазматическую мембрану (Clausen, 1996; Therien, Blostein, 2000; Лопина, 2001; Glynn, 2002; Schriener-Bobis, 2002). Можно считать установленным, что индуцированное активацией рецепторов ростовых факторов и гормонов быстрое изменение функциональной активности натриевого насоса связано с изменением кинетических параметров присутствующих в плазматической мембране транспортных единиц, а также с рекрутированием в мембрану новых транспортных комплексов из неактивного внутриклеточного пула. В последнее время внимание исследователей привлекают более поздние, длящиеся во времени изменения в работе ионных транспортеров и ионных каналов, непосредственно связанные с клеточным циклом. Лимфоциты периферической крови человека благодаря своей способности под действием митогенов выходить из состояния покоя G_0 и начинать клеточный цикл являются удобным объектом для проведения исследований, посвященных событиям, которые сопровождают прогрессию клетки в цикле.

Именно на лимфоцитах человека получены наиболее полные данные о динамике убаин-чувствительных потоков калия во время прогрессии $G_0 \rightarrow G_1 \rightarrow S$ и установлена связь между повышением транспортной активности натриевого насоса, бласттрансформацией и синтезом ДНК (Веренинов и др., 1991; Marakhova et al., 1998). Вместе с тем механизмы, контролируемые связанные с клеточным циклом изменения транспортной активности натриевого насоса, остаются малоизученными.

Ключевую роль в пролиферативном ответе лимфоцитов играют синтез Т-клеточного ростового фактора интерлейкина-2 (ИЛ-2), сборка на мембране высокоаффинного рецептора ИЛ-2 и активация ассоциированных с рецептором ИЛ-2 сигнальных молекул, результатом чего и является запуск собственно клеточного цикла в активированных Т-клетках (Lin, Leonard, 1997). Ранее нами было установлено, что долговременное повышение транспортной активности натриевого насоса и возрастание экспрессии каталитической $\alpha 1$ -субъединицы Na^+, K^+ -АТФазы приурочены к ИЛ-2-регулируемой стадии Т-клеточного ответа (Карицкая и др., 2005; Marakhova et al., 2005).

Для выяснения вопроса о том, какие сигнальные пути, инициируемые ИЛ-2, могут участвовать в регуляции экспрессии Na^+, K^+ -АТФазы в Т-лимфоцитах, предпринято данное исследование.

Материал и методика

Выделение и культивирование лимфоцитов. В работе использовали лимфоциты периферической крови человека. Лимфоциты выделяли по общепринятой схеме (Woyum, 1968) из свежей донорской крови. Лейкоцитарную фракцию отбирали после осаждения эритроцитов, добавляя в кровь 6%-ный раствор декстрана (Т500). Суспензии лейкоцитов (по 8 мл) наслаивали на 3 мл гистобака и центрифугировали в течение 30 мин при 600 g. После центрифугирования интерфазу переносили в пробирки объемом сначала 50 мл, затем 10 мл и 3—4 раза промывали фосфатно-солевым буфером (PBS) следующего состава (в mM): $NaCl$ — 137, Na_2HPO_4 — 8, KCl — 2.7, KH_2PO_4 — 1.5. Для удаления макрофагов клеточную суспензию после отмывки разбавляли средой RPMI без антибиотиков, содержащей 10 % сыворотки человека группы крови 0 (1), и помещали в пластиковые матрацы при 37 °C в атмосферу 5 % CO_2 . Через 40 мин полученную суспензию лимфоцитов разливали во флаконы по 40—50 мл с концентрацией клеток 2 млн/мл, а на следующие сутки суспензию переносили в пенициллиновые флаконы по 1.5 мл (для последующего измерения ионных потоков) и во флаконы по 10—15 мл с концентрацией 1.5—2.0 млн/мл. Клетки стимулировали фитогемагглютинином (ФГА, 10 мкг/мл) или преактивировали путем культивирования с ФГА в субмитогенной концентрации (0.8 мкг/мл) в течение 24 ч с последующей стимуляцией экзогенным ИЛ-2 (100 ед./мл). Ингибиторы киназы JAK3 тирфостин В42 (50 мкМ), WHI-P131 (75 мкМ) или ингибитор киназы ERK1/2 PD98059 (20 мкМ) добавляли в культуральную среду после 1-суточного культивирования с ФГА в субмитогенной концентрации за 1 ч до внесения экзогенного ИЛ-2.

Электрофорез и иммуноблотинг. Общие клеточные лизаты получали из свежeweделенных, покоящихся лимфоцитов и лимфоцитов, активированных соответствующими митогенами. Лимфоциты осаждали центри-

фугированием при 600 g в течение 10 мин, осадки промывали 3 раза холодным PBS и лизировали на льду 20 мин в лизирующем буфере (pH 7.4), содержащем 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1 % Тритона X-100, 0.5 % нонидета Р-40 (NP-40), 0.5 % дезоксихолата, 150 mM NaCl, по 1 mM EDTA, EGTA и PMSF, по 1 мкг/мл лейпептина, апротинина и пепстатина, по 1 mM Na_3VO_4 и NaF. Полученную смесь центрифугировали при 10 000 g в течение 15 мин при 4 °C. Супернатант отбирали, 5 мкл брали для определения концентрации белка. К остальному супернатанту добавляли буфер Лэммли для электрофоретических проб (40 mM Tris-HCl, pH 6.8, 20 % SDS, 20 % β -меркаптоэтанола и 40 % глицерина) из расчета 1 часть буфера на 4 части лизата.

Мембранные фракции клеточных лизатов получали путем мягкой гомогенизации клеток (после их осаждения и трехкратной отмывки холодным PBS) в буфере TES, pH 7.4 (10 mM триэтаноламина, 0.25 M сахарозы, по 1 mM EDTA, PMSF, Na_3VO_4 и NaF, по 1 мкг/мл лейпептина, апротинина и пепстатина), осаждения ядер и неразбитых клеток (10-минутным центрифугированием при 15 000 g, 4 °C) и последующего ультрацентрифугирования в течение 1 ч при 100 000 g и 4 °C. Полученный осадок растворяли в буфере TBS, pH 7.4 (20 mM Tris-HCl и 150 mM NaCl), добавляли Тритон X-100 до конечной концентрации 1 %, оставляли на 1 ч во льду и центрифугировали 15 мин при 10 000 g. К супернатанту добавляли буфер Лэммли (предварительно отобрав 10 мкл на определение концентрации белка) и инкубировали в течение 5 мин при 100 °C.

Количество общего белка в пробе оценивали по методу Бредфорд (Bradford, 1976).

Электрофоретическое разделение белков проводили методом диск-электрофореза в 7.5%-ном полиакриламидном геле в присутствии SDS с последующим полусухим электропереносом (0.8 мА/см², 1 ч 15 мин) на нитроцеллюлозную мембрану (Hybond-C Extra, Amersham Pharmacia Biotech, Швеция). На дорожку электрофорезного геля загружали по 50—70 мкг белка. Для визуализации белковых полос использовали краситель Ponceau S (Sigma, США). Отмывают от Ponceau S раствором 0.05%-ного TTBS, pH 7.4 (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl и 0.05 % Tween-20), мембрану инкубировали в растворе 5%-ного обезжиренного молока, приготовленном на TTBS, в течение 1 ч при комнатной температуре с целью избежания неспецифического связывания антител. Инкубацию с антителами проводили в течение ночи при 4 °C. От несвязавшихся антител мембрану отмывали раствором TTBS 4 раза по 5 мин и инкубировали со вторыми антителами в течение 1 ч при комнатной температуре. Мембрану снова четырежды промывали раствором TTBS. Визуализацию блотов проводили путем усиленной хемилюминесценции (ECL, Western blotting protocol, Amersham), которую регистрировали при экспонировании мембраны на пленку для рентгеновских снимков Fujifilm Super RX. Пленку сканировали с помощью сканера ARCUS 11 (AGFA) для оценки относительных изменений плотности проявленных полос, соответствующих белку $\alpha 1$ -субъединицы Na^+, K^+ -АТФазы.

Антитела. Для специфического выявления Na^+, K^+ -АТФазы использовали моноклональные антитела $\alpha 6F$ против $\alpha 1$ -субъединицы Na^+, K^+ -АТФазы, любезно предоставленные д-ром Д. Фамброх (Балтимор, США). Антитела разводили (из расчета 1 : 300) 5%-ным раствором обезжиренного молока в TTBS. В качестве вторых

использовали конъюгированные с пероксидазой хрена козы антитела, полученные против иммуноглобулинов мыши, — GAM-HRP (Sigma, США), приготовленные также на 5%-ном молоке, в разведении 1 : 20 000.

Поликлональные кроличьи антитела против фосфорилированных форм STAT3 и STAT5 (Cell Signaling, США) разводили (1 : 1000) 5%-ным раствором бычьего сывороточного альбумина в 0.1%-ном TTBS. В качестве вторых использовали конъюгированные с пероксидазой хрена козы антитела, полученные против иммуноглобулинов кролика, — GAR-HRP (Cell Signaling, США), приготовленные на 5%-ном обезжиренном молоке, в разведении 1 : 6000. Моноклональные мышьиные антитела против STAT3 (Transduction Laboratories, США) и вторичные козы антитела, полученные против иммуноглобулинов мыши, — GAM-HRP (Sigma, США), готовили на обезжиренном 5%-ном молоке в разведениях 1 : 1000 и 1 : 20 000 соответственно.

Выделение и определение мРНК. Общую РНК из лимфоцитов выделяли с помощью гуанидин-тиоцианатного метода. Обратную транскрипцию (ОТ) проводили в объеме 20 мкл, содержащем 2—3 мкл РНК 1 мкг случайных праймеров и 100 ед. MMLV (Gibco BRL, США), согласно инструкции фирмы-изготовителя. Праймеры для ПЦР были синтезированы согласно опубликованным последовательностям для $\alpha 1$ -субъединицы Na, K -АТФазы (прямой 5'-ATGGGAAGGGGTTGGACGTGATAA-3', обратный 5'-TTCTCACCATTTTCGAATCAACAAGGGCTT-3', продукт 530 pb) и для $\beta 1$ -субъединицы Na, K -АТФазы (прямой 5'-ACTGAAATTTCTTTCGTCСТААТ-3' и обратный 5'-ATCACTGGGTAAGTCTССА TTCTCACCATTTTCGAATCACAAGGGCTT-3', продукт 350bp). Праймеры обеспечивали специфичность амплификации кДНК, так как комплементарные им последовательности находятся в разных экзонах гена. ПЦР проводили в реакционном объеме 10 мкл, содержащем 2 мкл разведенной (1 : 6) кДНК, 0.5 мкМ каждого праймера, 0.2 мМ dNTP, 1.4 мМ MgCl_2 , 1 \times Hot-Taq-полимеразного буфера и 1 ед. Hot-Taq-полимеразы (Силекс, Россия). Температуру отжига праймера и количество циклов ПЦР выбирали для каждой пары праймеров (Веренинов и др., 2001). Специфичность ПЦР была подтверждена секвенированием. Продукты ПЦР (6 мкл) электрофоретически разделяли в 6%-ном ПААГ, окрашивали бромистым этидием и фотографировали с помощью цифрового фотоаппарата Nikon Coolpix 4500 при УФ-облучении. Параметры фотографирования подбирали в ходе предварительных экспериментов. Денситометрирование полос проводили с использованием программы NIH ImageJ.

Измерение входных потоков рубидия. Оценку функциональной активности Na^+, K^+ -АТФазы проводили путем измерения однонаправленных ионных потоков с помощью метода пламенного-эмиссионной фотометрии. Входной поток калия оценивали по накоплению лимфоцитами его физиологического аналога рубидия, добавляя RbCl на 30 мин в конечной концентрации 2.5 мМ (Веренинов и др., 1982). Поток рубидия, чувствительный к убаину, детектировали по разнице между общим накоплением рубидия и его входом в клетку в присутствии 0.05 мМ убаина в течение 30 мин. После инкубации с RbCl и убаином клетки осаждали центрифугированием в течение 3—5 мин при 600 г. Осадок пятькратно промывали охлажденным раствором MgCl_2 (85 мМ), не ресуспендируя, и заливали 1 мл 5%-ной трихлоруксусной кислотой. Содержание катионов в надосадочной жидкости

определяли на атомно-абсорбционном фотометре Perkin-Elmer AA-306. Далее осадок растворяли в 1 мл 0.1 н. NaOH для последующего определения содержания общего белка по методу Лоури. Концентрацию катионов выражали в мкмоль на 1 мг общего белка.

В работе использовали ФГА, убаин, гистопак-1.077, PD98059, WHI-P131 (Sigma, США), декстран T500 (Pharmacia, Швеция), тирфостин B42 (ISN, США), рекомбинантный ИЛ-2 (Биотех, Россия), среду RPMI 1600 (Flow, Шотландия), а также реактивы отечественного производства квалификации «хч» или «осч». Маточные растворы ФГА и убаина готовили на 0.14 М NaCl , ингибиторы киназ — на DMSO. Концентрация DMSO в тестирующих растворах с клетками не превышала 0.05 %.

Результаты и обсуждение

Влияние ингибиторов тирозинкиназы JAK на фосфорилирование STAT3 и STAT5, транспортную активность натриевого насоса и экспрессию $\alpha 1$ -субъединицы Na^+, K^+ -АТФазы. Известно, что ключевую роль в запуске ИЛ-2 пролиферативного ответа Т-лимфоцитов играют транскрипционные факторы STAT5 и STAT3 (Moriggi et al., 1999; Lin, Leonard, 2000; Buitenhuis et al., 2004). Гетеродимеризация цитоплазматических доменов субъединиц β и γ рецептора ИЛ-2 под действием ИЛ-2 индуцирует быструю активацию ассоциированных с рецептором нерецепторных тирозинкиназ семейства JANUS (JAK1 и JAK3). Активированные JAK фосфорилируют рецептор ИЛ-2 и запускают JAK/STAT- и Shc/MAP-киназные сигнальные пути (Lin, Leonard, 1997; Wang et al., 1999). Эти сигнальные каскады регулируют экспрессию специфических генов, которые контролируют запуск пролиферативного и иммунного ответов, рост клеток, дифференцировку и апоптоз.

При запуске пролиферации нормальных лимфоцитов человека долговременное повышение транспортной активности натриевого насоса и возрастание экспрессии каталитической $\alpha 1$ -субъединицы Na^+, K^+ -АТФазы приурочены к ИЛ-2-регулируемой стадии Т-клеточного ответа (Marakhova et al., 1999; Карицкая и др., 2005). Для выявления возможного участия JAK/STAT-пути в регуляции ИЛ-2-зависимой экспрессии Na^+, K^+ -АТФазы в настоящей работе использовали два ингибитора тирозинкиназ JAK — B42 (аналог Ag490) и WHI-P131. По литературным данным, тирфостин Ag490 не только подавляет фосфорилирование тирозинкиназы JAK2, но также ингибирует фосфорилирование JAK3 и тормозит индуцированную интерлейкин-2 пролиферацию Т-клеточной линии CTLL-2, а WHI-P131 является специфическим ингибитором тирозинкиназы JAK3 в лимфоидных клетках и не влияет на киназы JAK1 и JAK2 (Sudbeck et al., 1999; Wang et al., 1999).

В одном эксперименте на лимфоцитах, выделенных из крови одного донора и активированных разными митогенами в присутствии указанных ингибиторов, исследовали внутриклеточное содержание калия и натрия, ингибируемые убаином входные потоки рубидия, уровень фосфорилирования STAT3 и STAT5, а также рост лимфоцитов и уровень пролиферации в культуре. Данные точной ДНК-цитометрии показали, что оба использованных ингибитора подавляют частично пролиферативный ответ лимфоцитов человека на ФГА: по данным 8 опытов,

Влияние ингибиторов тирозинкиназ JAK3 (WHI-P131, AG490) и ERK1/2 (PD98059) на внутриклеточное содержание калия ([K]_i) и натрия ([Na]_i), уровень пролиферации (S + G₂ + M) и содержание белка в компетентных лимфоцитах, обработанных ФГА в немитогенной дозе (1 мкг/мл) в течение 20 ч и далее стимулированных ИЛ-2 (150 ед./мл)

Условия опыта	[K] _i , мкмоль на 1 г белка			[Na] _i , мкмоль на 1 г белка			S + G ₂ + M, %	Белок, мг на 1 пробу
	0	24 ч	48 ч	0	24 ч	48 ч	48 ч	48 ч
ИЛ-2	591	670	688	131	173	171	28.5	0.26
ИЛ-2 + WHI-P131	588	613	599	124	55	155	15.0	0.16
ИЛ-2 + AG490	570	582	595	198	200	200	19.0	0.15
ИЛ-2 + PD98059	588	627	600	119	146	165	16.0	0.18

Примечание. Концентрация WHI-P131 — 75 мкМ, AG490 — 50 и PD98059 — 20 мкМ. Приведены средние из измерений в 3 (ИЛ-2 + WHI-P131), 4 (ИЛ-2 + AG490 и ИЛ-2 + PD98059) и 10 (ИЛ-2) опытах. Данные для всех измеренных показателей в каждом опыте получены на лимфоцитах из крови одного донора.

через 48 ч стимуляции в присутствии ингибиторов число клеток в фазах S, G₂ и M было меньше в среднем на 48 %, чем в культурах, стимулированных ИЛ-2 без ингибитора (см. таблицу). Судя по такому показателю, как увеличение массы клеточного белка в стимулированных лимфоцитах, B42 и WHI-P131 снижают также скорость роста лимфоцитов во время пререпликативной стадии: в трех независимых экспериментах к 48 ч общее количество внутриклеточного белка в культуре лимфоцитов, стимулированных ИЛ-2 в присутствии ингибиторов, было на 30—40 % меньше, чем в параллельных культурах лимфоцитов, стимулированных ИЛ-2 без ингибиторов (см. таблицу).

Данные настоящего исследования подтвердили сделанные нами ранее выводы о различии динамики фосфорилирования STAT3 и STAT5 в лимфоцитах, стимулированных митогенами (Карицкая и др., 2005). В частности, в отличие от STAT5 фосфорилированные формы STAT3 (PY-STAT3) присутствуют как в покоящихся, так и в компетентных лимфоцитах, которые обрабатывались немитогенными дозами ФГА перед стимуляцией ИЛ-2 (рис. 1, а, дорожка 1, 2). Вследствие этого на фоне некоторого базального фосфорилирования возрастание уровня фосфорилирования STAT3 в ответ на ИЛ-2 не столь значительно (не более чем в 2.0—2.5 раза) по сравнению с таковым для STAT5 (рис. 1, а, дорожка 3). Как показано на рис. 1, а, дорожка 6, WHI-P131 (75 мкМ) подавляет индуцированное ИЛ-2 фосфорилирование STAT5 и STAT3, при этом ингибирование PY-STAT5 проявляется в большей мере, чем PY-STAT3.

Обработка «компетентных» лимфоцитов ингибиторами B42 или WHI-P131 снижала наполовину уровень экспрессии белка $\alpha 1$ Na⁺,K⁺-АТФазы, вызванной ИЛ-2, как через 24, так и через 48 ч стимуляции (рис. 1, б, в).

Длительная инкубация (до 48 ч) лимфоцитов, активированных ИЛ-2, в присутствии B42 (50 мкМ) или WHI-P131 (75 мкМ) не сопровождалась такими изменениями внутриклеточного содержания катионов, которые могли бы свидетельствовать о токсическом действии ингибиторов на клетки: в обработанных ингибиторами лимфоцитах поддерживается высокое содержание калия и низкое содержание натрия, т. е. сохраняется высокий ионный гетерогенитет, характерный для нормальных лимфоцитов (см. таблицу). Однако в присутствии как B42, так и WHI-P131 то нарастание убаин-чувствительного входа рубидия, которое сопровождает поздние стадии митоген-

ной активации лимфоцитов, не развивается (рис. 2). Следует отметить, что в условиях стимуляции лимфоцитов ИЛ-2 в присутствии ингибиторов всегда наблюдалось согласованное во времени и коррелирующее по интенсивности подавление и убаин-чувствительных потоков рубидия, и нарастания количества белка $\alpha 1$. Из этих данных следует, что в лимфоцитах, стимулированных в присутствии ингибиторов JAK3, возрастание транспортной активности Na⁺,K⁺-насоса и повышение экспрессии Na⁺,K⁺-АТФазы на уровне белка, характерное для пререпликативной стадии, отсутствуют.

Влияние ингибирования MAP-киназного сигнального пути на фосфорилирование ERK1/2, функциональную активность натриевого насоса и экспрессию $\alpha 1$ -субъединицы Na⁺,K⁺-АТФазы. В Т-лимфоцитах активация рецептора ИЛ-2 через адаптерный белок Shc индуцирует Ras/Raf/MEK/ERK/MAP-киназный сигнальный каскад (Berridge, 1997; Wang et al., 1999). В нашей работе о запуске MAP-киназного каскада судили по активации ERK1/2, двух финальных киназ этого каскада. Уровень активности ERK1/2 оценивали по наличию фосфорилированных по треонину и тирозину форм (Thr202/Tyr204).

Как и в случае ИЛ-2-зависимой активации белков семейства STAT, фосфорилированные формы ERK1/2 появлялись уже через 10 мин после добавления экзогенного ИЛ-2 к компетентным лимфоцитам, а к 24 ч уровень фосфорилирования ERK1/2 значительно увеличивался (рис. 3, а, дорожка 5). Предварительная обработка лимфоцитов ингибитором MEK1/ERK1/2 — PD98059 (20 мкМ) — отменяла возрастание фосфорилирования ERK1/2 как на 1-х мин стимуляции «компетентных» лимфоцитов ИЛ-2, так и при последующем культивировании в течение 24 ч в присутствии ИЛ-2 и ингибитора (рис. 3, а, дорожка 6). При стимуляции лимфоцитов ФГА в митогенной концентрации заметное нарастание уровня фосфорилирования ERK1/2, так же как и его снижение под действием PD98059, четко проявлялось после 24 ч инкубации с ФГА (рис. 3, а, дорожки 2, 3).

По данным 4 экспериментов, проведенных для выяснения роли MAP-киназного пути сигнализации в экспрессии Na⁺,K⁺-АТФазы, содержание белка $\alpha 1$ в мембранных фракциях после инкубации компетентных лимфоцитов в течение 48 ч с ИЛ-2 в присутствии PD98059 не превышало его содержания в контрольных мембранных фракциях компетентных лимфоцитов (рис. 3, б, дорожки 2, 4, в). Из

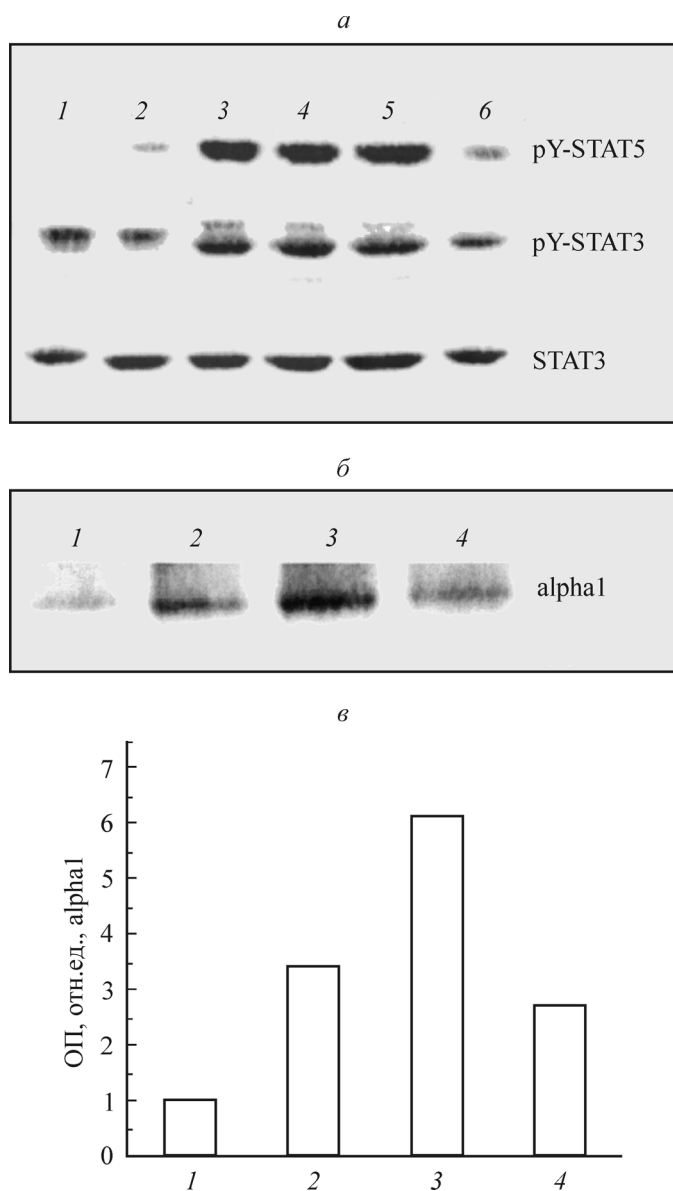


Рис. 1. Влияние ингибитора WHI-P131 на уровень фосфорилирования транскрипционных факторов STAT5 и STAT3 и экспрессию $\alpha 1$ -субъединицы Na^+, K^+ -АТФазы в лимфоцитах, стимулированных экзогенным ИЛ-2.

a — иммуноблот тотальных лизатов лимфоцитов человека, окрашенных антителами против STAT5 (PY-STAT5), фосфорилированного по тирозину 694, и STAT3 (PY-STAT3), фосфорилированного по тирозину 705; для оценки равномерности нанесения лизатов мембрану инкубировали в специальном буфере для удаления антител и подвергали повторной окраске с антителами против STAT3; дорожки: 1 — покоящиеся лимфоциты, 2 — «компетентные» лимфоциты, обработанные ФГА (1 мкг/мл) в течение 20 ч, далее стимулированные ИЛ-2 (150 ед./мл) в течение 10 (3), 20 (4) мин или 24 ч без ингибитора WHI-P131 (5) и с ингибитором, 75 мкМ (6). *б* — иммуноблот мембранных фракций тотальных лизатов лимфоцитов, окрашенных антителами $\alpha 6F$ против $\alpha 1$ -субъединицы Na^+, K^+ -АТФазы. *в* — изменения оптической плотности (ОП) полос, соответствующих $\alpha 1$ -белку Na^+, K^+ -АТФазы; столбики 1—4 соответствуют дорожкам 1, 2, 5 и 6 на рис. 1, *a*. Приведены данные 1 репрезентативного эксперимента из 3.

представленных данных следует, что ингибирование ERK1/2 — финальной киназы MAP-киназного пути сигнализации от рецептора ИЛ-2 — подавляет синтез каталитической $\alpha 1$ -субъединицы Na^+, K^+ -АТФазы по ходу пререпликативной стадии пролиферативного ответа лимфоцитов.

Инкубация лимфоцитов, стимулированных ИЛ-2 в присутствии PD98059, не сопровождалась какими-либо значительными изменениями ионного гетерогенитета: внутриклеточное содержание калия в обработанных ингибитором лимфоцитах сохранялось высоким, а содержание натрия — низким (см. таблицу). Однако при стимуляции компетентных лимфоцитов экзогенным ИЛ-2 в присутствии PD98059 убаин-чувствительный вход рубидия практически не изменяется в течение всего периода наблюдения (48 ч), тогда как в параллельных культурах лимфоцитов, стимулированных ИЛ-2 без PD98059, вход рубидия увеличивается с 12.2 до 48.0 мкмоль на 1 г белка за 30 мин (почти в 4 раза). Таким образом, при выключении MAP-киназных путей сигнализации от рецептора ИЛ-2 наблюдаются одновременное подавление транспортной активности натриевого насоса и снижение уровня экспрессии каталитической $\alpha 1$ -субъединицы Na^+, K^+ -АТФазы.

Изменения уровня мРНК субъединиц $\alpha 1$ и $\beta 1$ Na^+, K^+ -АТФазы в стимулированных лимфоцитах. Являются ли долговременное повышение транспортной активности натриевого насоса и возрастание экспрессии Na^+, K^+ -АТФазы в активированных лимфоцитах следствием синтеза белков транспортного комплекса натриевого насоса, который контролируется на транскрипционном уровне? Как видно на рис. 4, уже че-

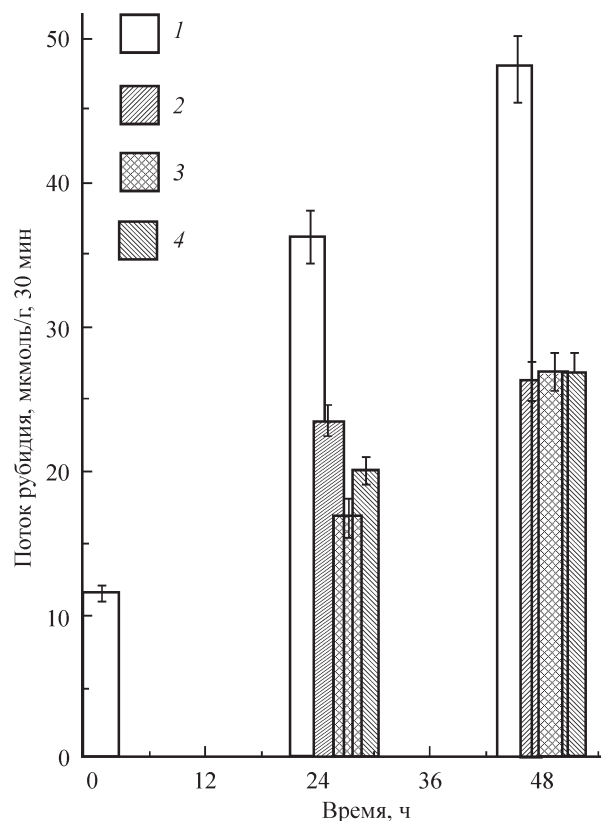


Рис. 2. Влияние ингибиторов киназ JAK3 (WHI-P131 и AG-490) и MEK1/ERK1/2 (PD98059) на убаин-чувствительные входные потоки рубидия в «компетентных» лимфоцитах, стимулированных экзогенным ИЛ-2.

1 — изменения убаин-чувствительных входных потоков рубидия по ходу стимуляции «компетентных» лимфоцитов экзогенным ИЛ-2 (150 ед./мл), 2 — то же в лимфоцитах, стимулированных ИЛ-2 в присутствии WHI-P131 (75 мкМ), 3 — то же в присутствии AG-490 (50 мкМ), 4 — то же в присутствии PD98059 (20 мкМ). Приведены средние значения ($\bar{x} \pm s_x$) для 3—6 экспериментов.

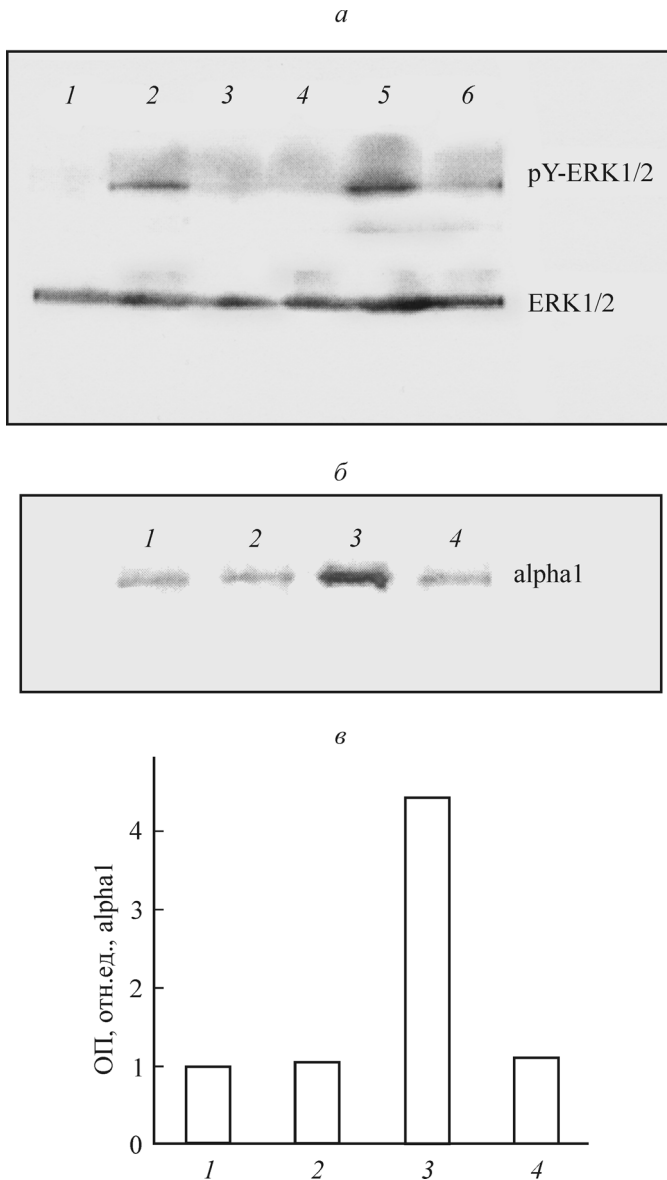


Рис. 3. Влияние PD98059 (ингибитора MEK1/ERK1/2) на изменения уровня фосфорилирования ERK1/2 при активации лимфоцитов экзогенным ИЛ-2 и ФГА и на уровень экспрессии $\alpha 1$ -субъединицы Na^+, K^+ -АТФазы в лимфоцитах, активированных экзогенным ИЛ-2.

а — иммуноблот тотальных лизатов лимфоцитов человека, окрашенных антителами против ERK1/2 (PY-ERK1/2), фосфорилированного по Thr202/Tyr204; для оценки равномерности нанесения лизатов мембрану инкубировали в специальном буфере для удаления антител и подвергали повторной окраске с антителами против ERK1/2; *дорожки*: 1 — покоящиеся лимфоциты, 2 — лимфоциты, стимулированные ФГА (10 мкг/мл), 3 — то же в присутствии 20 мкМ PD98059, 4 — «компетентные» лимфоциты, обработанные ФГА (1 мкг/мл) в течение 20 ч, далее стимулированные ИЛ-2 (150 ед./мл) в течение 24 ч без PD98059 (5) или с PD98059, 20 мкМ (6). *б* — иммуноблот мембранных фракций тотальных лизатов лимфоцитов, окрашенных антителами $\alpha 6\text{F}$ против $\alpha 1$ -белка Na^+, K^+ -АТФазы. *в* — изменения оптической плотности (ОП) полос, соответствующих $\alpha 1$ -белку Na^+, K^+ -АТФазы; *столбики* 1—4 соответствуют *дорожкам* 1, 4—6 на рис. 3, *а*. Приведены данные 1 репрезентативного эксперимента из 4.

рез 4 ч после стимуляции нормальных лимфоцитов ФГА (10 мкг/мл) содержание $\alpha 1$ мРНК и $\beta 1$ мРНК начинает возрастать, а через 24 ч во всех опытах содержание $\alpha 1$ мРНК и $\beta 1$ мРНК в 2.5—3.5 раза превышает уровень в нестимулированных лимфоцитах (рис. 4, *а*, *дорожки* 1, 3;

рис. 4, *б*). В компетентных, активированных немитогенной дозой ФГА, лимфоцитах $\alpha 1$ мРНК и $\beta 1$ мРНК Na^+, K^+ -АТФазы идентифицируется крайне слабо, а в компетентных лимфоцитах, стимулированных ИЛ-2 в течение 24 ч, содержание мРНК этих субъединиц увеличивается в 3.5—4.0 раза (рис. 4, *а*, *дорожки* 4—7; рис. 4, *в*). Обнаруженные изменения в содержании $\alpha 1$ мРНК и $\beta 1$ мРНК Na^+, K^+ -АТФазы дают основание предполагать, что в активированных лимфоцитах человека во время переходного периода к пролиферации и в долговременной регуляции Na^+, K^+ -насоса участвуют транскрипционные механизмы.

Закономерности экспрессии генов в Т-лимфоцитах при запуске пролиферативного и иммунного ответов детально исследовались. В настоящее время благодаря возможности регистрировать одновременно изменения экспрессии многих, практически всех генов в активированных Т-клетках в свободных таблицах изменений РНК стали проявляться также данные по экспрессии генов отдельных ионных транспортеров (Teague et al., 1999; Kobayashi et al., 2002). Полагая, что гены Na^+, K^+ -АТФазы относятся к генам системы жизнеобеспечения (housekeeping), которые не являются ключевыми для запуска пролиферации, исследователи, как правило, не анализируют детально их изменения. Обнаруженное нами увеличение содержания мРНК Na^+, K^+ -АТФазы в стимулированных лимфоцитах человека вместе с данными о согласованном изменении функциональной и белковой экспрессии этого ионного транспортера дает основание говорить о том, что экспрессия генов системы «housekeeping» также закономерно регулируется в Т-клетках в переходный период из состояния покоя к пролиферации, и важно идентифицировать те механизмы, которые осуществляют связь между ключевыми сигнальными событиями в клетке и системами ионного транспорта.

В литературе имеются немногочисленные исследования, посвященные роли внутриклеточных сигнальных молекул (путей) в регуляции активности натриевого насоса в связи с изменением функционального состояния клеток разного типа. Значительная часть этих данных относится к участию MAP-киназ в «быстрой» регуляции транспортной активности Na^+, K^+ -АТФазного насоса. Основным механизмом «быстрой» регуляции является возрастание численности функционирующих насосов в плазматической мембране за счет доставки неактивных транспортных комплексов из эндоплазматического ретикулаума и их встраивания в мембрану или снижение численности мембранных насосов за счет удаления посредством эндоцитоза работающих ионных помп из поверхностной мембраны. Можно считать экспериментально доказанным участие MAP-киназ в «быстрой» регуляции активности Na^+, K^+ -АТФазного насоса в плазматической мембране при действии некоторых гормонов, ростовых факторов и С-пептидов (Nakar et al., 2002; Al-Khalili et al., 2004; Kreydiyyeh, Al-Sadi, 2004; Khundmiri et al., 2005; Zhong et al., 2005). Сообщается, что в альвеолярных эпителиальных клетках фибробластный ростовой фактор в 1-е ч действия увеличивает транспортную активность и экспрессию $\alpha 1$ -субъединицы Na^+, K^+ -АТФазы, а ингибитор MAP-киназного пути сигнализации U0126 подавляет индукцию активности Na^+, K^+ -АТФазы (Upadhyay et al., 2003). Что касается роли MAP-киназ в долговременной регуляции Na^+, K^+ -АТФазы за счет синтеза *de novo* субъединиц Na^+, K^+ -АТФазы, то данные по этому вопросу единичны. Обнаружено, что MAPK/ERK-зависимые механизмы участвуют в регуляции экспрессии Na^+, K^+ -АТФазы в аль-

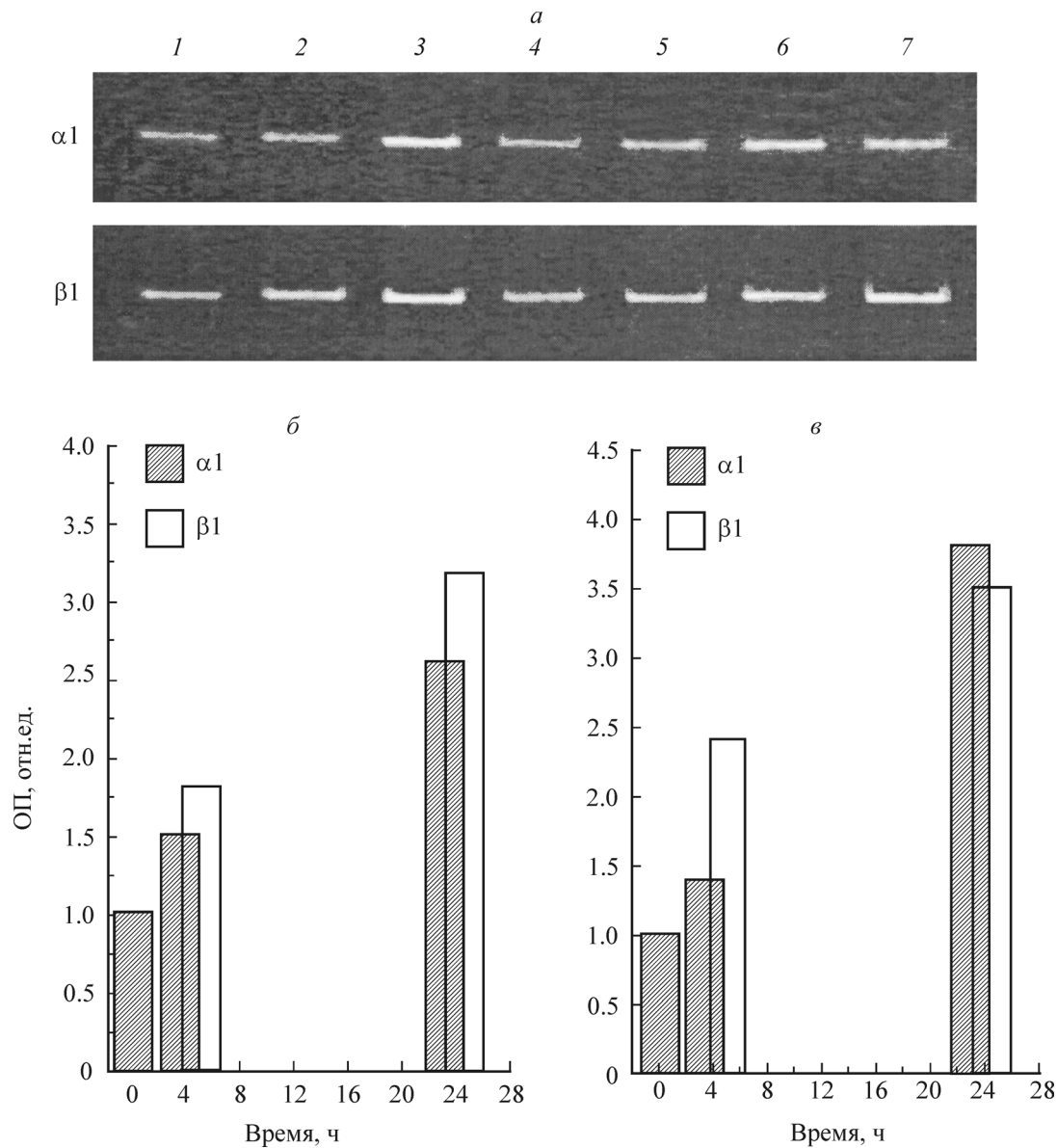


Рис. 4. Изменение экспрессии $\alpha 1$ мРНК и $\beta 1$ мРНК Na^+, K^+ -АТФазы по ходу пролиферативного ответа лимфоцитов, стимулированных ФГА или экзогенным ИЛ-2.

а — электрофорез ПЦР-продуктов с праймерами к $\alpha 1$ - и $\beta 1$ -субъединицам Na^+, K^+ -АТФазы в лимфоцитах, которые стимулировали ФГА (10 мкг/мл, дорожки 1—3) или ИЛ-2 (156 ед.мл, дорожки 4—7); 1 — покоящиеся лимфоциты, 2 — лимфоциты, стимулированные ФГА (10 мкг/мл) в течение 4 ч, 3 — то же в течение 24 ч, 4 — «компетентные» лимфоциты, обработанные ФГА (1 мкг/мл) в течение 20 ч и далее стимулированные ИЛ-2 (150 ед./мл) в течение 4 (5), 24 (6) или 48 (7) ч. *б, в* — изменения оптической плотности (ОП) полос, представленных на рис. 4, *а* и соответствующим содержанию $\alpha 1$ мРНК и $\beta 1$ мРНК Na^+, K^+ -АТФазы в лимфоцитах, которые стимулировали ФГА (*а*) или ИЛ-2 (*в*) в течение 4 или 24 ч. *б, в*: за 1 ед. ОП принято содержание соответствующих мРНК в покоящихся (*б*) или «компетентных» (*в*) лимфоцитах. Приведены данные 1 репрезентативного эксперимента из 7, проведенных на лимфоцитах от разных доноров.

веолярных эпителиальных клетках: ингибиторы PD98059 и U0129 блокировали индуцированную допамином и изопротеренолом и развивающуюся в течение длительного времени (48—72 ч) экспрессию $\beta 1$ -субъединицы Na^+, K^+ -АТФазы на уровне белка и мРНК (Pesce et al., 2003).

В литературе отсутствуют исследования, посвященные изучению роли сигнальных белков семейства STAT в регуляции активности ионных транспортеров или ионных каналов. Известно, что основными мишенями транскрипционных факторов STAT3 и STAT5 в лимфоцитах являются гены, играющие решающую роль в регуляции пролиферативного и иммунного ответов и апоптоза. Вероятнее всего, связь между STAT-факторами и генами Na^+, K^+ -АТФазы не является прямой, а опосредована через

некие регуляторные элементы, хотя исключить возможность прямого влияния транскрипционных факторов STAT на экспрессию субъединиц Na^+, K^+ -АТФазы нельзя. Тот факт, что подавление активности этих транскрипционных факторов в присутствии специфических ингибиторов влечет за собой снижение транспортной активности ионного насоса, указывает на тесную связь между механизмами, которые контролируют внутриклеточный ионный гомеостаз во время клеточного цикла, и механизмами, которые определяют пролиферативный статус клетки. Важно отметить, что нарушение функционирования ионных транспортных систем влечет за собой подавление полноценного иммунного или пролиферативного ответа. В дополнение к убедительно аргументированным выво-

дам относительно вовлеченности ионного транспорта в процессы поддержания пролиферации и трансформации клеток, которые основаны на антипролиферативном действии специфических ингибиторов систем ионного транспорта, привлекают внимание следующие данные. Обнаружено, что выключение $\beta 3$ -субъединицы Na^+, K^+ -АТФазы с помощью специфических антител подавляет активацию Т- и В-лимфоцитов, при этом в присутствии антител, взаимодействующих с $\beta 3$ -субъединицей, подавляется продукция интерферона-гамма, ИЛ-2, ИЛ-4 и ИЛ-10 (Chiampanichayakul et al., 2002).

Совокупность имеющихся данных свидетельствует о том, что при запуске и формировании пролиферативного ответа Т-лимфоцитов уровень экспрессии Na^+, K^+ -АТФазного насоса контролируется в связи с необходимостью регулирования ионного гомеостаза и гетерогенитета в условиях интенсивного роста клеток по ходу пререпликационной стадии и подготовки к репликации ДНК и делению. Механизмы, регулирующие экспрессию Na^+, K^+ -АТФазы, включаются на ИЛ-2-зависимой стадии Т-клеточного ответа, а долговременное повышение транспортной активности натриевого насоса, в основе которого лежит синтез новых субъединиц Na^+, K^+ -АТФазы, контролируется через JAK/STAT- и ERK1/2-МАР-киназные пути внутриклеточной сигнализации.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 06-04-48445-а), программы президента РФ «Ведущие научные школы» (НШ-523.2006.4).

Список литературы

- Веренинов А. А., Васильева И. О., Юринская В. Е., Матвеев В. В., Глушанкова Л. Н. 2001. Исследование «групповой» экспрессии мРНК ионных транспортеров АТФВ1, NHE1 и НКСС1, β -актина, глицерофосфатдегидрогеназы, белков-регуляторов пролиферации и апоптоза p53, Vcl-2, IL-2 и киназы hSGK на пререпликационной стадии активации лимфоцитов человека. Цитология. 43 (6) : 602—611.
- Веренинов А. А., Виноградова Т. А., Ивахнюк И. С., Марахова И. И., Торопова Ф. В. 1982. Применение пламенно-эмиссионного анализа для измерения потоков щелочных катионов через клеточную мембрану. Цитология. 24 (1) : 98—103.
- Веренинов А. А., Гусев Е. В., Казакова О. М., Клименко Е. М., Марахова И. И., Осипов В. В. 1991. Транспорт и распределение моновалентных катионов при бласттрансформации лимфоцитов периферической крови человека, активированных фитогемагглютинином. Цитология. 33 (11) : 78—93.
- Веренинов А. А., Марахова И. И. 1986. Транспорт ионов у клеток в культуре. Л.: Наука. 292 с.
- Карицкая И. А., Аксенов Н. Д., Виноградова Т. А., Марахова И. И. 2005. Регулируемая интерлейкином-2 экспрессия Na^+, K^+ -АТФазы в активированных лимфоцитах человека. Цитология. 47 (1) : 28—37.
- Лопина О. Д. 2001. Взаимодействие каталитической субъединицы Na^+, K^+ -АТФазы с клеточными белками и другими эндогенными регуляторами. Биохимия. 66 (10) : 1389—1400.
- Al-Khalili L., Kotova O., Tsuchida H., Ehrén I., Féraille E., Krook A., Chibalin A. V. 2004. ERK1/2 mediates insulin stimulation of Na^+ , K^+ -ATPase by phosphorylation of the alpha-subunit in human skeletal muscle cells. J. Biol. Chem. 279 : 25 211—25 218.
- Boyum A. 1968. Separation of leucocytes from blood and bone marrow. J. Clin. Lab. Invest. 21 : 9—29.
- Bradford M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72 : 248—254.
- Buitenhuis M., Coffey P. J., Koenderman L. 2004. Signal transducer and activation of transcription 5 (STAT 5). Int. J. Biochem. Cell Biol. 36 : 2120—2124.
- Chiampanichayakul S., Szekeres A., Khunkaewla P., Moonson S., Leksa V., Drbal K., Zlabinger G. J., Hofer-Warbinek R., Stockinger H., Kasinrerker W. 2002. Engagement of Na, K -ATPase $\beta 3$ subunit by a specific mAb suppresses T and B lymphocyte activation. Int. Immunol. 14 : 1407—1414.
- Clausen T. 1996. Long- and short-term regulation of Na^+, K^+ -pump in skeletal muscle. News Physiol. Sci. 11 : 24—30.
- Dornand J., Favero J., Bonnafous J. C., Mani J. C. 1986. Mechanism whereby ouabain inhibits human T lymphocyte activation: effect on the interleukin 2 pathway. Immunobiology. 171 (4—5) : 436—450.
- Glynn I. M. 2002. A hundred years of sodium pumping. Annu. Rev. Physiol. 64 : 1—18.
- Grinstein S., Dixon S. J. 1989. Ion transport, membrane potential and cytoplasmic pH: changes during activation. Physiol. Rev. 69 : 417—481.
- Kaplan J. G., Owens A. 1978. Membrane cation transport and the control of proliferation of mammalian cells. Annu. Rev. Physiol. 40 : 19—41.
- Khundmiri S. J., Dean W. L., McLeish K. R., Lederer E. D. 2005. Parathyroid hormone-mediated regulation of Na^+/K^+ -ATPase requires ERK-dependent translocation of protein kinase Calpha. J. Biol. Chem. 280 : 8705—8713.
- Kobayashi S. D., Voyich J. M., Buhl C. L., Stahl R. M., DeLeo F. R. 2002. Global changes in gene expression by human polymorphonuclear leukocytes during receptor-mediated phagocytosis: cell fate is regulated at the level of gene expression. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 99 : 6901—6906.
- Kreydiyyeh S. I., Al-Sadi R. 2004. The signal transduction pathway that mediates the effect of interleukin-1 beta on the Na^+/K^+ -ATPase in LLC-PK1 cells. Pflugers Arch. 448 : 231—238.
- Lin J.-X., Leonard W. J. 1997. Signalling from the IL-2 receptor to the nucleus. Cytokine Growth Factor Rev. 8 : 313—332.
- Lin J.-X., Leonard W. J. 2000. The role of Stat5a and Stat5b in signalling by IL-2 family cytokines. Oncogene. 19 : 2566—2576.
- Marakhova I. I., Ivanova A. E., Toropova F. V., Vereninov A. A., Vinogradova T. A. 1999. Functional expression of the Na^+/K^+ -pump is controlled via a cyclosporin A-sensitive signalling pathway in activated human lymphocytes. FEBS Lett. 456 : 285—289.
- Marakhova I. I., Karitskaya I. A., Aksenov N. D., Zenin V. V., Vinogradova T. A. 2005. Interleukin-2-dependent regulation of Na/K pump in human lymphocytes. FEBS Lett. 579 : 2773—2780.
- Marakhova I. I., Vereninov A. A., Toropova F. V., Vinogradova T. A. 1998. Na^+/K^+ -ATPase pump in activated human lymphocytes: on the mechanisms of rapid and long-term increase in K influxes during the initiation of phytohemagglutinin-induced proliferation. Biochim. biophys. acta. 1368 : 61—72.
- Moolenaar W. H., Mummetry C. L., van der Saag P. T., de Laat S. W. 1981. Rapid ionic events and the initiation of growth in serum-stimulated neuroblastoma cells. Cell. 23 : 789—798.
- Moriggl R., Topham D. J., Teglund S., Sxsl V., McKay C., Wang D., Hoffmeyer A., van Deursen J., Sangster M. Y., Bunting K. D., Grosveld G. C., Ihle J. N. 1999. Stat5 activation is uniquely associated with cytokine signalling in peripheral T cells. Immunity. 11 : 225—230.
- Narkar V., Hussain T., Lokhandwala M. 2002. Role of tyrosine kinase and p44/42 MAPK in D(2)-like receptor-mediated stimulation of Na^+ , K^+ -ATPase in kidney. Amer. J. Physiol. 282 : F697—F702.
- Orlov S. N., Taurin S., Tremblay J., Hamet P. 2001. Inhibition of Na^+/K^+ -pump affects nucleic acid synthesis and smooth muscle cell proliferation via elevation of the $[\text{Na}^+]/[\text{K}^+]$ ratio: possible implication in vascular remodelling. J. Hypertens. 19 : 1559—1565.
- Pesce L., Comellas A., Sznajder J. I. 2003. Beta-adrenergic agonists regulate $\text{Na}-\text{K}$ -ATPase via p70S6k. Amer. J. Physiol. 285 : L802—L807.

Rozengurt E. 1981. Stimulation of Na influx, Na-K pump activity and DNA synthesis in quiescent cultured cells. *Adv. Enzyme Regul.* 19 : 61—85.

Schiener-Bobis G. 2002. The sodium pump. Its molecular properties and mechanics of ion transport. *Eur. J. Biochem.* 269 : 2424—2433.

Sudbeck E. A., Liu X. P., Narla R. K., Mahajan S., Ghosh S., Mao C., Uckun F. M. 1999. Structure-based design of specific inhibitors of Janus kinase 3 as apoptosis-inducing antileukemic agents. *Clin. Cancer Res.* 5 : 1569—1582.

Szamel M., Leufgen H., Kurrle R., Resch K. 1995. Differential signal transduction pathway regulating interleukin-2 synthesis and interleukin-2 receptor expression in stimulated human lymphocytes. *Biochim. biophys. acta.* 1235 : 33—42.

Teague T. K., Hildeman D., Kedl R. M., Mitchell T., Rees W., Schaefer B. C., Bender J., Kappler J., Marrack P. 1999. Activation

changes the spectrum but not the diversity of genes expressed by T cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 96 : 12 691—12 696.

Therien A. G., Blostein R. 2000. Mechanisms of sodium pump regulation. *Amer. J. Physiol.* 279 : C541—C566.

Upadhyay D., Lecuona E., Comellas A., Kamp D. W., Sznajder J. I. 2003. Fibroblast growth factor-10 upregulates Na,K-ATPase via the MAPK pathway. *FEBS Lett.* 545 : 173—176.

Wang L. H., Kirken R. A., Erwin R. A., Yu C.-R., Farrar W. L. 1999. JAK3, STAT, and MAPK signalling pathways as novel molecular targets for the tyrophostin AG-490 regulation of IL-2-mediated T cell response. *J. Immunol.* 162 : 3897—3904.

Zhong Z., Davidescu A., Ehren I., Ekberg K., Jornvall H., Wahren J., Chibalin A. V. 2005. C-peptide stimulates ERK1/2 and JNK MAP kinases via activation of protein kinase C in human renal tubular cells. *Diabetologia.* 48 : 187—197.

Поступила 23 VIII 2007

LONG-TERM REGULATION OF Na^+, K^+ -ATPASE PUMP IN HUMAN LYMPHOCYTES: THE ROLE OF JAK/STAT- AND MAPK-SIGNALING PATHWAYS

I. A. Karitskaya, N. D. Aksenov, I. O. Vasiljeva, E. G. Strelkova, I. I. Marakhova¹

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg;

¹ e-mail: iim@mail.cytspb.rssi.ru

In interleukin-2 (IL-2)-induced human blood lymphocytes, the Na^+/K^+ pump function (assessed by ouabain-sensitive Rb^+ influx), the abundance of Na^+, K^+ -ATPase $\alpha 1$ -subunit (determined by Western blotting) and the $\alpha 1$ - and $\beta 1$ -subunits mRNA of Na^+, K^+ -ATPase (RT-PCR), as well as the phosphorylation of STAT5 and STAT3 family proteins and ERK1/2 kinase have been examined. A 3.5—4.0-fold increase in the expression of $\alpha 1$ - and $\beta 1$ -subunits mRNA of Na^+, K^+ -ATPase was found at 24 h of IL-2 stimulation. The inhibitors of JAK3 kinase (B-42, WHI-P431) was shown to decrease both the phosphorylation of STATs and the rise in the ouabain-sensitive rubidium influx as well as the increased abundance of Na^+, K^+ -ATPase $\alpha 1$ -subunit. The inhibition of the protein kinases ERK1/2 by PD98059 (20 μM) suppressed the $\alpha 1$ -subunit accumulation. All the kinase inhibitors tested did not alter the intracellular content of monovalent cations in resting and IL-2-stimulated lymphocytes. It is concluded that MAPK and JAK/STAT signaling pathways mediate the IL-2-dependent regulation of the Na^+, K^+ -ATPase expression during the lymphocyte transition from resting stage to proliferation.