

На правах рукопису

Я К И М О В И Ч
Ігор Андрійович

**ВИЯВЛЕННЯ, ОЧИСТКА ТА БІОЛОГІЧНІ
ВЛАСТИВОСТІ ФАКТОРА
РОСТУ ФІБРОБЛАСТІВ З КЛІТИН
ЗАРОДКІВ В'ЮНА
MISGURNUS FOSSILIS L.**

03.00.04 — Біохімія

А в т о р е ф е р а т
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

ЛЬВІВ — 1994

І. Якимович



00778882 (1)

Робота виконана у відділі біологічних регуляторних систем клітини Інституту фізіології і біохімії тварин УААН України.

- Науковий керівник** — доктор біологічних наук **Р. С. СТОЙКА.**
- Офіційні опоненти:** — доктор біологічних наук, професор **І. І. РОЗГОНІ,**
— доктор біологічних наук **М. Д. ЛУЦИК.**
- Провідна установа** — Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького АН України.

Захист дисертації відбудеться « 8 » лютого 1994 р. о « 10 » год. на засіданні спеціалізованої вченої ради Д.020.14.01 при Інституті фізіології і біохімії тварин Української Академії Аграрних Наук за адресою: 290034, м. Львів-34, вул. В. Стуса, 38.

З дисертацією можна ознайомитися у бібліотеці інституту фізіології і біохімії тварин УААН.

Автореферат розісланий « 6 » січня 1994 р.

Учений секретар
спеціалізованої вченої ради

ЛНБ ім. В. Стефаніка
АН України

Я. І. КИРИЛІВ

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність проблеми. Регуляція проліферації і диференціації клітин під час початкових стадій ембріонального розвитку має ряд особливостей у порівнянні з регуляцією цих процесів у дорослих організмів. У цей період розвитку, коли ще не сформована нейро-ендокринна система тварин, важливу роль відіграють поліпептидні фактори росту (ПФР) [Стойка, Кусень, 1988; Грунц, 1990].

Вперше думку про те, що фактор росту фібробластів (ФРФ) може приймати участь в індукції утворення мезодерми під час ембріогенезу в амфібій, висловив Слек та співавтори [Slack et al., 1987]. Згодом, аналогічний висновок про роль ФРФ було зроблено в результаті досліджень процесів ембріонального розвитку у птахів і соавців [Lui, Nicoll, 1988; Olwin et al., 1991].

Невідомо, чи міститься ФРФ в зародках костистих риб і чи клітини цих зародків є компетентними до його дії. Невивченим залишається питання і про особливості біологічної дії ФРФ холоднокровних хребетних тварин. Такі дані є важливими, оскільки зародки деяких видів риб, поряд із зародками амфібій, використовуються як модель для в'ясування закономірностей регуляції проліферації та диференціації клітин під час ембріонального розвитку [Костомарова, 1974, 1975].

Мета та завдання дослідження. Головною метою роботи було встановити, чи може фактор росту фібробластів виконувати регуляторну роль у клітинах ранніх зародків костистих риб. Для досягнення поставленої мети у роботі ставилися такі основні завдання:

1. виявити у клітинах зародків в'юна, ізольованих на стадії пізньої бластули, поліпептидний фактор росту з ФРФ-подібною біологічною активністю та очистити його;
2. вивчити фізико-хімічні та біологічні властивості ФРФ з клітин зародків в'юна і порівняти їх з такими властивостями основного ФРФ біка;
3. виявити та охарактеризувати специфічні рецептори ФРФ у клітинах зародків в'юна.

Наукова новизна роботи. Показано, що клітини зародків костистої риби в'юна, ізольовані на стадії пізньої бластули, містять

фактори росту, які за фізико-хімічними (молекулярна маса, спорідненість до гепарину, поведінка під час іонообмінної хроматографії на колонці, заповненій КМ-сефадексом), імунологічними властивостями і за біологічною активністю відносяться до родини ФРФ.

З клітин ранніх зародків риб виділений і частково очищений ФРФ-подібний фактор росту в кількості, достатній для дослідження його властивостей. Виявлено значну подібність біологічних властивостей ФРФ з клітин зародків в'юна і сФРФ з мозку бика, який використовувався іншими дослідниками під час вивчення механізмів індукції розвитку мезодерми [Slack et al., 1987, 1989; Ruiz i Altaba, Melton, 1989].

В клітинах зародків в'юна на стадії пізньої бластули виявлені високоафінні специфічні рецептори ФРФ та вивчені їх властивості.

Науково-практичне значення роботи. Виявлення ФРФ-подібних факторів росту і специфічних рецепторів цих ПРР у клітинах зародків костистої риби в'юна дозволяє запропонувати цей об'єкт як альтернативну експериментальну модель для вивчення молекулярних механізмів індукції розвитку мезодерми у тварин.

Отримані результати дозволяють поширити на представників класу риб раніше зроблені висновки щодо ролі окремих ПРР як ембріональних індукторів під час процесів розвитку у тварин. Враховувачи ці результати, доцільно поширити на інших хребетних, а можливо і на безхребетних, дослідження, оскеровані на в'ясування біологічної ролі цих ПРР.

Основні положення, що виносяться на захист.

1. Клітини зародків в'юна, ізольовані на стадії пізньої бластули, піддаються регуляторному впливу ФРФ-подібних факторів росту, оскільки вони містять ці біорегулятори і мають їх специфічні рецептори.

2. ФРФ-подібні фактори росту з клітин ранніх зародків в'юна за своїми фізико-хімічними, імунологічними властивостями та біологічною активністю відповідають сФРФ бика.

Апробація роботи та публікації. Матеріали дисертації доповідалися та обговорювалися на радянсько-фінійському симпозиумі з біо-

логії розвитку (Суздаль, 1991), VI Українському біохімічному з'їзді (Київ, 1992), нараді "Біологія клітини у культурі" (Санкт-Петербург, 1992), конференціях молодих вчених, семінарах і засіданні Вченої ради Відділення регуляторних систем клітини Інституту біохімії АН України.

За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано три статті та три тези доповідей.

Структура та об'єм роботи. Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, опису матеріалів і методів, викладу результатів дослідження та їх обговорення, висновків і опису цитованої літератури (235 джерел). Робота викладена на 147 сторінках друкованого тексту, ілюстрована 23 малюнками та 1 таблицею.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Зародки в'юна (*Misgurnus fossilis* L.) на стадії пізньої бластули (9 годин розвитку при 21°C) отримували за допомогою методу, запропонованого Костомаровою та Нейфахом (1984). Клітини зародків виділяли використовуючи рекомендації Луцка і співавторів [Луцк та ін., 1983].

Для виявлення ФРФ під час його очистки з клітин зародків в'юна та дослідження біологічних властивостей цього фактора росту у роботі використовували ембріональні фібробласти ліній NIN-3T3 і Swiss-3T3 миші та клітини лінії CHO-719, отримані з яєчників китайського хом'ячка. Всі лінії клітин отримували з Всєросійської колекції клітинних культур (Інститут цитології РАН, Санкт-Петербург, Росія). Культуру фібробластів ембріонів людини отримували згідно до загальновишаної методики [Адамс, 1983]. Клітини вирощували у середовищі Ігла, модифікованому Дульбекко (середовище DME, Flow Lab., Великобританія), доповненому 10 % (за об'ємом) сироватки крові плодів ВРХ (Діалек, Білорусія).

ФРФ з клітин зародків в'юна виділяли згідно до методу, запропонованого Господаровичем [Gospodarowicz, 1987]. Клітини гомогенізували при 4°C у 20 мл лізисного розчину (0.01 М буфер тріс-HCl, pH 7.2; 1 мМ динатрієва сіль етилендіамінтетраацетату (Serva, ФРН); 0.5 мМ фенілметилсульфонілфторид (Serva, ФРН); 1 мМ

беназamidин (Serva, ФРН); 25 мкг/мл аprotинину (Sigma, США); 25 мкг/мл лейпептину (Serva, ФРН) у присутності 1 М NaCl. Гомогенат центрифугували протягом 40 хв зі швидкістю 20 000 об/хв на центрифугі K-24 (Janetzky, Німеччина). Надосадову рідину діалізували через мембрану (Serva, ФРН), яка затримує речовини з м.м. понад 3-5 кДа, проти 0.1 М Na-фосфатного буферу (pH 7.0) протягом 12 год. Ці та всі подальші операції виконували при 4°C.

Отриманий екстракт клітин наносили на колонку, заповнену KM-сефадексом С-50 (Pharmacia, Швеція) і зрівноважену 0.1 М Na-фосфатним буфером (pH 7.0). Незв'язаний матеріал вимивали з колонки 0.15 М NaCl. Зв'язані з катіонообмінником речовини, елювали за допомогою градієнту концентрації NaCl від 0.15 до 0.6 М. Отримані фракції діалізували через мембрану (3-5 кДа) проти 0.1 М NaCl в 0.01 М тріс-HCl буфері (pH 7.2). Аліквоти кожної фракції перевіряли на здатність посилювати інтенсивність включення [³H]-тимідину в ДНК клітин лінії NIH-3T3 за умов їх субстратзалежного росту.

Фракції, отримані під час промивання колонки з катіонообмінником 0.6 М NaCl, об'єднували і наносили на колонку, заповнену гепарин-сефарозом CL-6B (Pharmacia, Швеція) і зрівноважену в 0.01 М буфері тріс-HCl (pH 7.2). Елюцію речовин, що сорбувалися на колонці, здійснювали за допомогою зростаючого від 0.1 М до 3.0 М градієнту концентрації NaCl. Отримані фракції діалізували проти 0.1 М NaCl в 0.01 М тріс-HCl буфері (pH 7.2) і визначали в них концентрацію білку за допомогою методу Лоурі (Lowry et al., 1951). Біологічну активність кожної фракції перевіряли, використовуючи як тест-систему клітини лінії NIH-3T3.

Фракції з ФФФ-подібною активністю повторно наносили на колонку з гепарин-сефарозом CL-6B. Речовини, що зв'язувалися при цьому, вимивали за допомогою ступінчатого підвищення концентрації NaCl в елюючому буфері (0.1, 0.6, 1.1, 1.6 і 3 М NaCl в 0.01 М буфері тріс-HCl, pH 7.2). Отримані фракції діалізували проти 0.1 М NaCl в 0.01 М тріс-HCl буфері (pH 7.2) і визначали в них концентрацію білку за допомогою методу Лоурі. Вихід речовин, що володіють ріотстимулюючою активністю, контролювали, як описано ви-

ще.

Електрофоретичне дослідження отриманого препарату ФРФ в'юна проводили на пластинках поліакриламідного гелю (ПААГ, градієнт концентрації акриламід у 10-18 %) у присутності додецилсульфату натрію (ДДС-Na) згідно до методу, запропонованого Леммлі [Lemmli, 1970]. Білкові фракції виявляли шляхом їх фарбування Кумасі яскраво-блакитним R-250 (Serva, ФРН) згідно до методу [Zehr et al., 1989].

Рістстимулюючу активність препарату ФРФ в'юна досліджували, використовуючи псевдонормальні фібробласти лінії Swiss-3T3, NIH-3T3 та фібробласти ембріонів людини за умов моношарової культури [Brigstock et al., 1990; Karlow et al., 1990]. Інтенсивність субстратнезалежної проліферації клітин лінії CHO-719 з яєчників китайського хом'ячка, стимульованої досліджуваним фактором росту, визначали за кількістю утворених ними колоній у напіврідкому культуральному середовищі, що містило 0.33 % агару [Rizzino, 1987].

Імуно-дот-реакції і Western-blot-аналіз препарату ФРФ в'юна здійснювали, як описано [Tsang и др., 1988]. Препарат основного ФРФ з мозку бика і поліклональні антитіла проти цього фактора росту люб'язно надані О.О.Гаряєвим і І.А.Філатовим (ІНЦ медичної біотехнології МСЗР, Росія).

Отримання цитосолю клітин лінії Swiss-3T3 та визначення активності S6-кінази здійснювали, як описано [Pelech et al., 1986, Дробот та ін., 1989].

Вплив досліджуваних факторів на транспорт Ca^{2+} у клітині вивчали за допомогою загальновищаного методу [Gonzales et al., 1989].

Дослідження адатності ФРФ з клітин зародків в'юна конкурувати з $[^{125}I]$ -ФРФ за зв'язування з високоафінними мембранними рецепторами здійснювали, використовуючи клітини лінії Swiss-3T3 [Lee et al., 1989].

Для визначення специфічного зв'язування $[^{125}I]$ -ФРФ клітини (2×10^5 на пробу) зародків в'юна, ізольовані на стадії пізньої бластули, інкубували у присутності зростаючих концентрацій

[¹²⁵I]-оФФ протягом 4-х год при 4°C у розчині Стейнберга, який містив 0.5 % БСА. Після закінчення інкубації клітини промивали 500 мкл розчину Стейнберга з 0.5 % БСА. Ліганд, зв'язаний неспецифічними гепариноподібними центрами, видаляли інкубуванням клітин протягом 1 хв у розчині Стейнберга з додаванням гепарину (250 мкг/мл) і промиванням у двох змивках розчину Стейнберга з БСА. Радіоактивність в отриманих пробах вимірювали на γ-лічильнику "Сотру Gamma" (LKB, Швеція). Неспецифічне зв'язування визначали як кількість [¹²⁵I]-оФФ, екстрагованого після гепаринової екстракції 1 % розчином Тритону X-100 з клітин, що інкубувалися у присутності 100-кратного надлишку неміченого оФФ. Розрахунок кількості центрів зв'язування оФФ і K_d для рецепторів цього фактора росту здійснювали згідно до методу Скетчарда [Scatchard, 1949].

Всі дослідження повторювали не менше 2-4 разів в 3-4 паралельних експериментах у кожному варіанті. Кожна точка графіків, наведених на рисунках, та ордината гістограм відповідає середньому значенню M. Середню похибку m отриманого результату вираховували за величиною середньої квадратичної похибки σ. Порівняння двох мінливих величин здійснювали на підставі показника вірогідності різниці t (критерій Ст'юдента). Відмінність між величинами вважали достовірною, коли P < 0.05.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Результати досліджень, проведених з використанням ранніх варіантів амфібій, свідчать про можливу участь оФФ у регуляції процесів ембріонального розвитку, зокрема в індукції утворення третього зародкового листка - мезодерми [Kimelman, Kirschner, 1987, 1988; Slack et al., 1987, 1989; Woodland, Jones, 1988; Musci et al., 1990]. В яйцеклітинах та ембріонах амфібій і птахів за допомогою антитіл до основного оФФ були виявлені поліпептиди, подібні до оФФ [Kimelman et al., 1988; Joseph-Silverstein et al., 1989]. У літературі є також дані про експресію мРНК рецепторів оФФ у клітинах ембріонів тварин цих класів [Musci et al., 1990; Aizawa et al., 1991; Olwin et al., 1991]. Однак, ми не знайшли ро-

біт, у яких вивчалася присутність ФРФ-подібних факторів росту та їх рецепторів у ембріонах риб. Крім того, біологічні властивості цих факторів росту та характеристики їхніх рецепторів не досліджувалися і у зародках амфібій.

1. Виявлення та очистка ФРФ з клітин зародків в'юна

Встановлено, що 1 М NaCl в 0.01 М Tris-HCl буфері (рН 7.2) екотрагує з клітин зародків в'юна речовини, що стимулюють синтез ДНК у фібробластах ліній NIH-3T3 і Swiss-3T3, а також в ембріональних фібробластах людини у первинній культурі (рис. 1). Ці клітинні лінії використовувалися багатьма дослідниками як тест-система для виявлення біологічної активності ФРФ [Rudland et al., 1974; Kaibuchi et al., 1986; Presta et al., 1988; Shipley et al., 1989; Brigstock et al., 1990; Story, 1991]. Оскільки в наших умовах найчутливішими до дії ФРФ виявилися клітини лінії NIH-3T3 (рис. 1), то ми використовували саме їх як тест-систему для виявлення ФРФ в'юна під час його очистки з екотракту клітин зародків в'юна.

Фракціонування згаданого екотракту на колонці, заповненій катіонообмінником КМ-сефадек, виявило два піки елюції речовин, здатних посилювати інтенсивність біосинтезу ДНК у клітинах лінії NIH-3T3 (рис. 2). Перший пік спостерігається при низьких концентраціях NaCl (0.2 М), коли з колонки вимивається більшість білків екотракту. Речовини другого піку володіють більш ніж у 2 рази вищою мітогенною активністю і вимиваються з колонки при 0.6 М NaCl. Необхідно відзначити, що подібні за характером профілі елюції були отримані іншими дослідниками, які використовували катіонообмінну хроматографію під час очистки факторів росту, що належать до родини ФРФ [Gospodarowicz, 1987; Thomas, 1987; Brigstock et al., 1990]. Згідно до їх даних, ФРФ елюється при 0.6 М NaCl. Виходячи з цих результатів, ми відібрали для подальшої очистки речовини, що володіли найвищою опорідненістю до гранул КМ-сефадек-у.

Однією з характерних особливостей факторів росту, що належать до родини ФРФ, є їх висока спорідненість до гепарину [Shing et al., 1984; Vladavsky et al., 1987]. Тому загальноприйнятим ме-

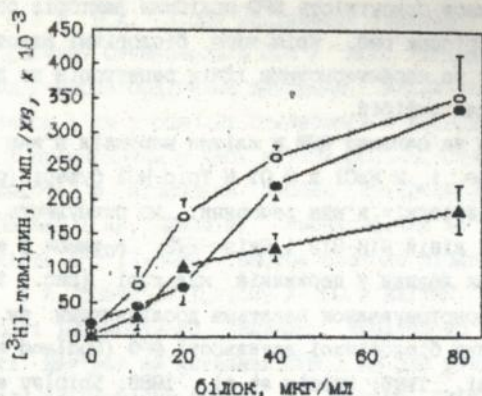


Рис. 1. Вплив речовин, що екстрагуються з клітин зародків в'юна 1 М розчином NaCl у 0.01 М Трио-НСІ буфері (рН 7.1), на включення $[^3\text{H}]$ -тимідину в ДНК клітин ліній NIH-3T3 (○), Swiss-3T3 (●) і ембріональних фібробластів людини (▲).

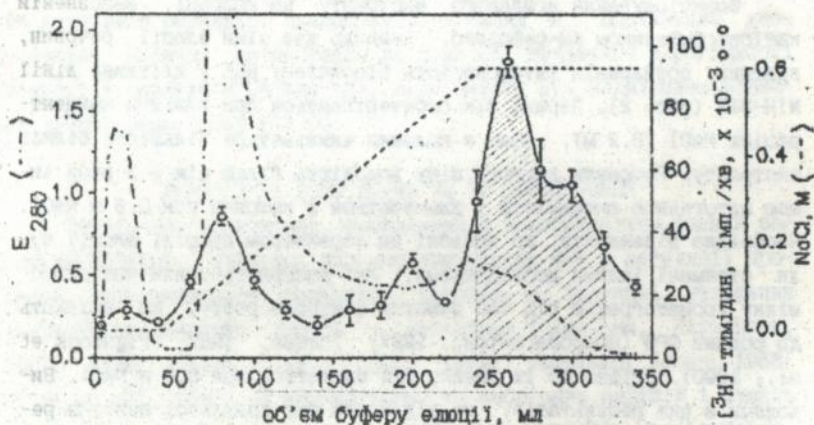


Рис. 2. Хроматографічне фракціонування білків, екстрагованих з клітин зародків в'юна 1 М NaCl, на колонці, заповненій катіонообмінником ЮМ-сефадексом (заштрихована область відповідає фракціїм, відібраним для подальшої очистки)

тодом виділення та очистки цих факторів є афінна хроматографія на носіях, що містять ковалентно зв'язаний гепарин [Gospodarowicz et al., 1984; Gospodarowicz, 1987]. Для очистки ФРФ в'яна ми використовували хроматографію на колонці, заповненій гепарин-сефарозою CL-6B (рис. 3). Встановлено, що певною біологічною активністю володіють речовини, які не споріднені до гепарину або слабо зв'язуються ним. Однак, більшість речовин, здатних посилювати інтенсивність включення [³H]-тимідину в ДНК клітин лінії NIH-3T3; зв'язуються гранулами гепарин-сефарози і вимивається з колонки під час елюції розчином 1-2 М NaCl (рис. 3).

З метою кращої очистки та концентрування препарату ФРФ в'яна здійснювали повторну хроматографію фракцій, які були відібрані з колонки, заповненої гепарин-сефарозою (рис. 4). Елюцію речовин, зв'язаних з гепарином, проводили за допомогою ступінчатого підвищення концентрації NaCl. Більшість речовин, здатних посилювати інтенсивність включення [³H]-тимідину в ДНК клітин лінії NIH-3T3, вимивається з колонки елюючим буфером при концентрації NaCl більшій за 1 М. Оскільки найвищою мітогенною активністю володіли речовини, що вимивалися при 1.1 М NaCl, то ми вибрали саме цю хроматографічну фракцію для наступного вивчення біологічних властивостей ФРФ з клітин зародків в'яна.

Електрофоретичне дослідження отриманого нами препарату ФРФ в'яна в ПААГ у присутності ДДС-Na показало, що переважна більшість білків, присутніх у препараті, мігрують у зоні білків з м.м. 15-16 кДа (рис. 5). Використовуючи Western-blot-аналіз, ми встановили, що саме з цими білками специфічно взаємодіють антитіла проти основного ФРФ з мозку бика (рис. 6). За даними літератури м.м. ФРФ осавців коливається в межах від 14 до 18.5 кДа [Gospodarowicz et al., 1978, 1984, 1987; Esch et al., 1985b; Gimenez-Gallego et al., 1985; Klagsbrun et al., 1987a].

Щоб перевірити, чи в отриманому нами препараті ФРФ в'яна містяться речовини з біологічною активністю, відмінною від активності ФРФ, ми використали поліклональні антитіла проти сФРФ з мозку бика. Встановлено, що ці антитіла в концентрації 200 мкг/мл повністю пригнічують синтез ДНК, індукований сФРФ з мозку бика, у

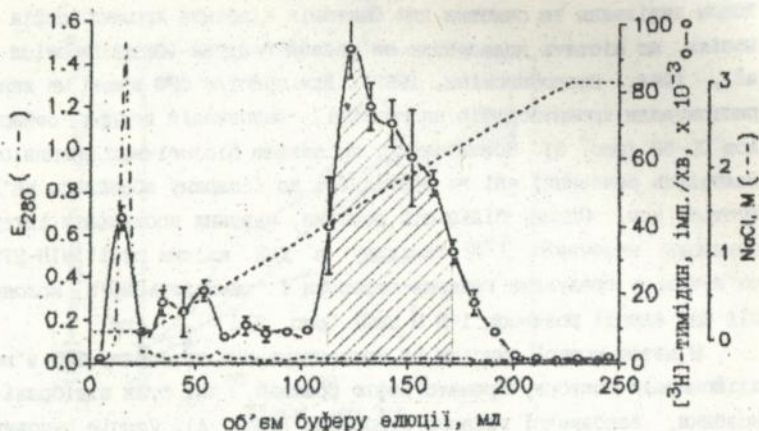


Рис. 3. Хроматографічна очистка ФРФ з клітин зародків в'юна на колонці, заповненій гепарин-сефарозою (заштрихована область відповідає фракціям, відібраним для подальшої очистки)

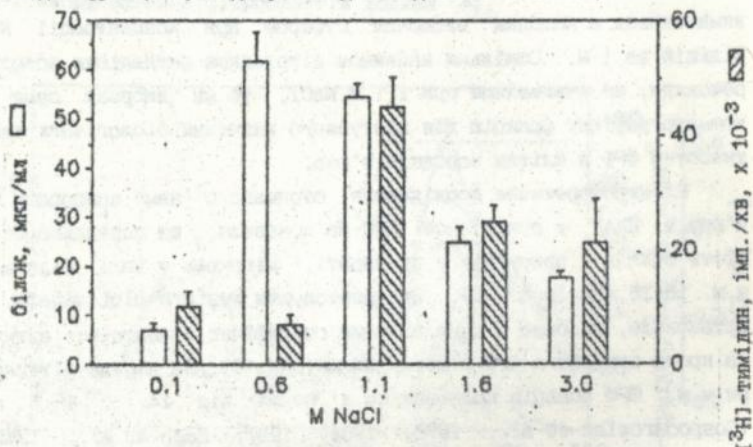


Рис. 4. Вплив на включення [³H]-тимідину в ДНК клітин лінії NIH-3T3 білків, що елюються при різних концентраціях NaCl в колонці, заповненій гепарин-сефарозою.

клітинах лінії N1H-3T3 (рис. 7,а). Такий самий ефект викликало додавання 300 мкг/мл антитіл проти оФРФ з мозку бика до середовища, в якому інкубувалися клітини цієї лінії, стимульовані ФРФ в'юна (рис. 7,б). Ці результати дозволяють стверджувати, що отриманий нами препарат ФРФ в'юна виявляє лише ФРФ-подібну рістостимулюючу активність, а присутні в ньому домішки інших білків не впливають на цю активність.

Щоб підтвердити поліпептидну природу ФРФ в'юна, досліджено чутливість цього фактора росту до нагрівання і дії трипсину. Як видно з даних, наведених на рис. 8, оФРФ з мозку бика і ФРФ в'юна втрачають свою рістостимулюючу активність щодо клітин лінії N1H-3T3 після обробки препаратів цих факторів росту трипсином (0.5 мкг/мл) чи інкубації протягом 10 хв при 70°C. Ці дані свідчать про те, що ФРФ в'юна, так само як і ФРФ осавців, є термолабільним поліпептидом.

Цікаво відзначити, що гепарин, до якого фактори росту з родини ФРФ виявляють високу спорідненість, практично не впливає на мітогенну активність оФРФ з мозку бика, але майже у 8 разів посилює таку активність ФРФ в'юна (рис. 9). Крім того, у присутності гепарину зростає стійкість ФРФ в'юна та оФРФ з мозку бика до нагрівання. Так, нагрівання препаратів цих факторів росту протягом 10 хв при 70°C у присутності гепарину майже не зменшує їх біологічної активності (рис. 9).

Таким чином, нами вперше показано, що клітини зародків в'юна містять біорегулятори з ФРФ-подібною біологічною активністю. За імунологічними та деякими фізико-хімічними властивостями ці фактори росту подібні до основного ФРФ осавців.

2. Вивчення біологічних властивостей ФРФ з клітин зародків в'юна

У наступній серії експериментів ми дослідили деякі біологічні властивості ФРФ в'юна і порівняли їх з такими властивостями оФРФ з мозку бика. З даних, наведених на рис. 10, видно, що ФРФ в'юна має дещо нижчу, ніж оФРФ з мозку бика, мітогенну активність щодо клітин ліній N1H-3T3, Swiss-3T3 та фібробластів ембріонів людини. Максимальне стимулювання включення [³H]-тимідину в ДНК

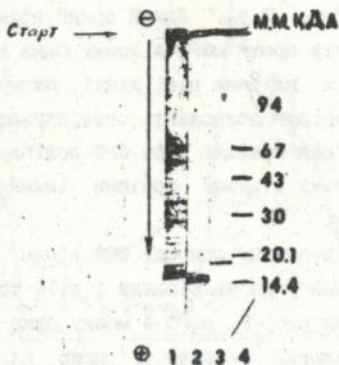


Рис. 5. Электрофоретичне розділення на пластинках ПААГ у присутності ДДС-На білків фракцій, отриманих під час елюції колонки, заповненої галарин-сефарозою, 1.1 М NaCl (доріжка N 1), 1.6 М NaCl (доріжка N 2) і препарату оФРФ з мозку бика (доріжка N 3) Доріжка N 4 - набір білків-маркерів

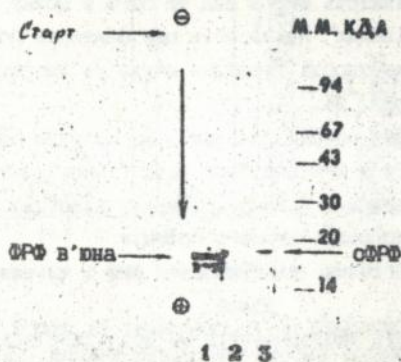


Рис. 6. Western-blot-аналіз білків фракцій, отриманих під час елюції колонки, заповненої галарин-сефарозою, 1.1 М NaCl (доріжка N 1), 1.6 М NaCl (доріжка N 2) і препарату оФРФ з мозку бика (доріжка N 3).

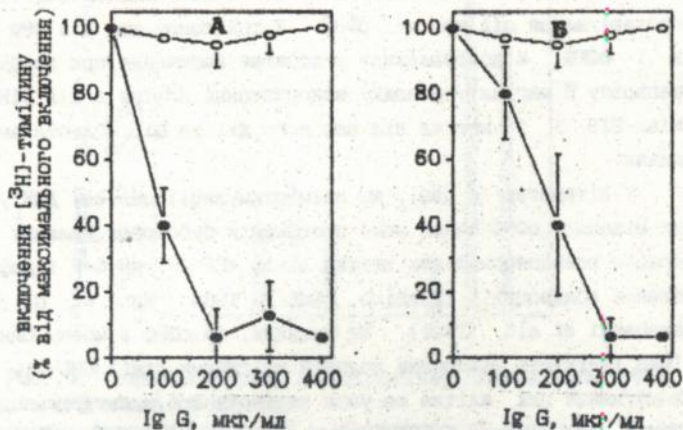


Рис. 7. Вплив поліклональних антитіл до оФРФ з мозку бика на інтенсивність включення $[^3\text{H}]$ -тимідину в ДНК клітин лінії NIH-3Т3, що стимулювалися: А) оФРФ з мозку бика; Б) ФРФ в'юна

● - у присутності специфічних антитіл до оФРФ; ○ - у присутності Ig G неімунізованого кролика

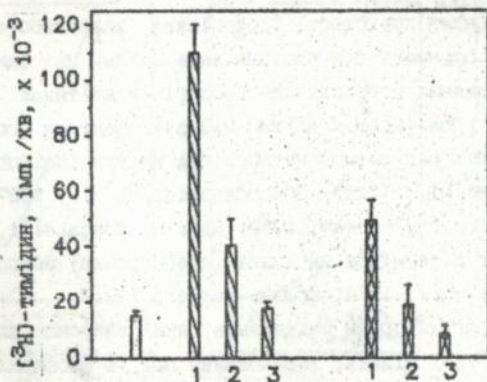


Рис. 8. Вплив трипсину і нагрівання (70°C , 10 хв) на адатність оФРФ (10 нг/мл) і ФРФ в'юна (5 мкг/мл) підвищувати інтенсивність включення $[^3\text{H}]$ -тимідину в ДНК клітин лінії NIH-3Т3

1 - нативні фактори росту; 2 - фактори росту, оброблені трипсином; 3 - фактори росту після прогрівання; - оФРФ з мозку бика; - ФРФ в'юна; - у відсутності факторів росту

клітин під дією ФРФ в'юна було у 2.5-3 рази нижчим від того, що спостерігалося під час дії оФРФ. У той самий час дія ФРФ в'юна, як і оФРФ, є дозавалежною і досягає насичення при концентрації препарату 5 мкг/мл у випадку використання клітин ліній NIH-3T3 і Swiss-3T3 і 1 мкг/мл під час його дії на фібробласти ембріонів людини.

У літературі є дані, що крім стимуляції синтезу ДНК у клітинах-мішенях, оФРФ також може посилювати суботратнезалежну проліферацію псевдонормальних клітин ліній AKR-2B, NR-6-R і диференційованих хондроцитів [Rizzino, Ruff, 1986; Kato et al., 1987; Takahashi et al., 1991]. Ми виявили, що оФРФ з мозку бика і ФРФ в'юна індукують утворення колоній клітинами лінії CHO-719 під час інкубування цих клітин за умов напіврідкого культурального середовища, що містило 0.33% агару. Максимальна кількість колоній, утворених цими клітинами, спостерігалася у присутності 5 нг/мл оФРФ і 5 мкг/мл препарату ФРФ в'юна (рис. 11). Таким чином, крім мітогенної дії на клітини-мішені, ФРФ в'юна викликає ще й фенотипічну трансформацію таких клітин.

Важливі докази подібності біологічних властивостей оФРФ і ФРФ в'юна були отримані під час вивчення впливу цих факторів росту на перебіг деяких метаболічних процесів у клітинах. Відомо, що крім впливу на проліферацію клітин-мішеней, фактори росту з родини ФРФ індукують ряд змін у метаболізмах клітин [Kaibuchi et al., 1986; Bouche et al., 1987; Gospodarowicz et al., 1987; Whice et al., 1987; Burgess, Maciag, 1989; Rifkin, Moscatelli, 1989]. Ці ефекти об'єднують терміном множинна (плейотропна) відповідь клітини [Rudland et al., 1974; Cross, Dexter, 1991].

Важливим регуляторним механізмом, який запускає швидкий синтез нових клітинних білків, індукований ПРФ, є фосфорилування рибосомального білку S6 [Pelech et al., 1986; Дробот и др., 1989]. Як видно з рис. 12, у цитозольній фракції клітин лінії Swiss-3T3, що перебували у фазі G₀, практично не виявляється активність кінази білку S6. Однак, після обробки цих клітин оФРФ з мозку бика, ФРФ в'юна, епідермальним фактором росту та, особливо, 10 % сироваткою крові ВРХ активність S6-кінази значно зростає. Слід від-

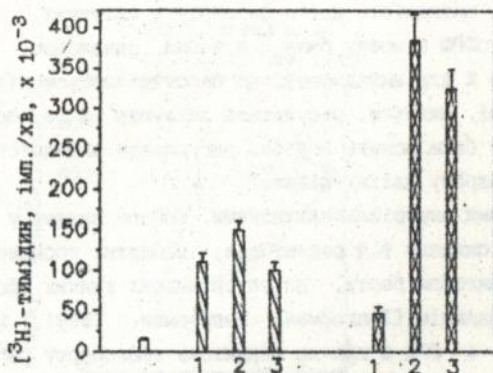


Рис. 9. Вплив гепарину на біологічну активність оФРФ (10 нг/мл) і ФРФ в'юна (5 мкг/мл)
 1 - нативні фактори росту; 2 - у присутності гепарину; 3 - після прогрівання у присутності гепарину
 ▨ - оФРФ з мозку бика; ▩ - ФРФ в'юна; □ - у відсутності факторів росту

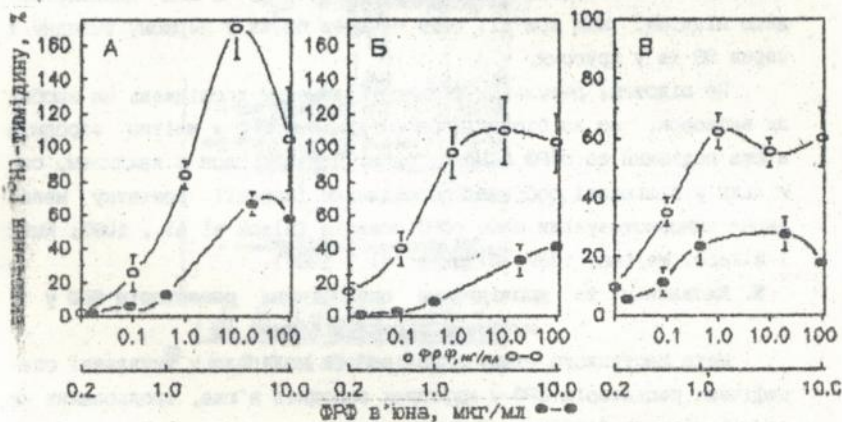


Рис. 10. Вплив ФРФ в'юна (●) і оФРФ з мозку бика (○) на інтенсивність включення ³H-тимідину у ДНК клітин: А) лінія NIH-3Т3; Б) лінія Swiss-3Т3; В) фібробласти ембріона людини

значити, що активність цього ферменту у клітинах, стимульованих ФРФ в'юна і оФРФ з мозку бика, є майже однаковою, і становить приблизно 50 % від активності, що опостерігається під час дії сироватки крові. Наведені результати вказують на те, що ФРФ в'юна і оФРФ з мозку бика можуть подібно регулювати активність білок-синтезуючого апарату клітин-мішеней.

Важливими внутрішньоклітинними посередниками у передачі регуляторного сигналу від рецепторів, зайнятих гормоном або поліпептидним фактором росту, до внутрішньоклітинних ефекторних систем є іони кальцію [Теппермен, Теппермен, 1989]. Ми дослідили вплив оФРФ і ФРФ в'юна на швидкість транспорту Ca^{2+} у клітини. Встановлено, що ФРФ в'юна викликає значне посилення транспорту [$^{45}Ca^{2+}$] у фібробласти лінії NIH-3T3 (рис. 13). Цей ефект, так само як і ефект, викликаний дією оФРФ, характеризується дозозалежністю і насичуваністю. Динаміка проникнення Ca^{2+} у клітини, на які діяли ФРФ в'юна, є подібною до динаміки проникнення цих іонів, що опостерігалася при використанні оФРФ з мозку бика (рис. 14). Проте максимальний ефект під час дії ФРФ в'юна виявляється дещо пізніше, ніж при дії оФРФ – через 60 хв у першому випадку і через 30 хв у другому.

На підставі результатів цього фрагменту досліджень ми зробили висновок, що за біологічною активністю ФРФ з клітин зародків в'юна подібний до оФРФ з мозку бика. Цей висновок є важливим, оскільки у більшості робіт по дослідженню індукції розвитку мезодерми використовували саме оФРФ свавців [Slack et al., 1987; Ruiz i Altaba, Melton, 1989; Slack et al., 1989].

3. Виявлення та дослідження специфічних рецепторів ФРФ у клітинах зародків в'юна

Мета наступного етапу нашої роботи полягала у виявленні специфічних рецепторів ФРФ у клітинах зародків в'юна, ізольованих на стадії пізньої бластули. З даних, наведених на рис. 15, видно, що ФРФ з клітин зародків в'юна конкурує з [^{125}I]-оФРФ за зв'язування з рецепторами останнього на поверхні клітин лінії Swiss-3T3. Це передбачає подібність будови рецептор-зв'язуючих доменів обох факторів росту і можливість використання ними спільних високоспе-

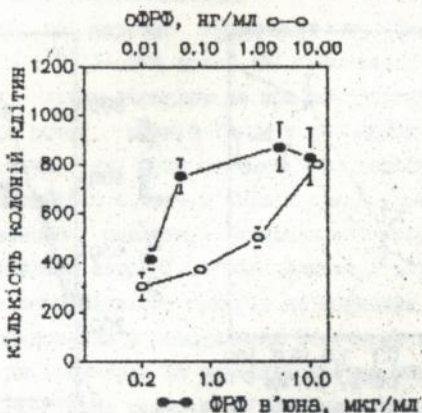


Рис. 11. Вплив ФРФ в'юна (●) і оФРФ з мозку бика (○) на інтенсивність субстратнезалежної проліферації клітин лінії CHO-719

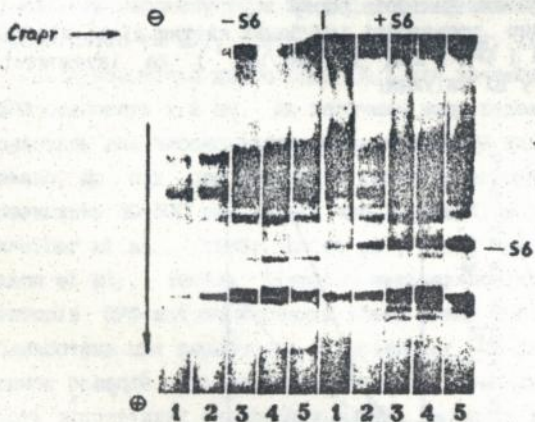


Рис. 12. Вплив 10 нг/мл оФРФ (2), 5 мкг/мл ФРФ в'юна (3), 10 нг/мл ЕФР (4) і 10 % сироватки крові плодів ВРХ (5) на активність кінази білку S6 в клітинах лінії Swiss-3T3
1 - при відсутності факторів росту

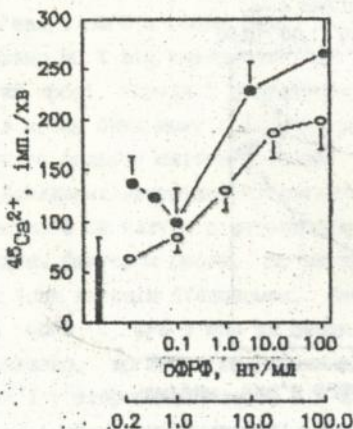


Рис. 13. ОФРФ в'юна, мкг/мл

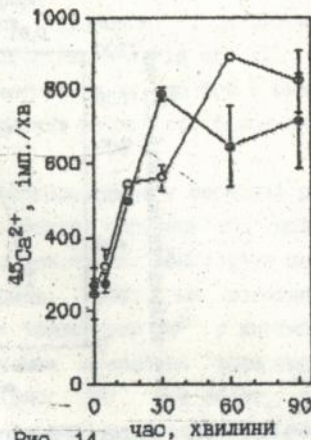


Рис. 14. час, хвилини

Рис. 13. Вплив ОФРФ (●) і ОФРФ в'юна (○) на інтенсивність транспорту $^{45}\text{Ca}^{2+}$ у клітини лінії NIH-3T3
 ■■■■ - при відсутності факторів росту

Рис. 14. Вплив тривалості інкубації клітин лінії NIH-3T3 з ОФРФ (10 нг/мл, ●) і ОФРФ в'юна (5 мкг/мл, ○) на інтенсивність транспорту $^{45}\text{Ca}^{2+}$ у ці клітини.

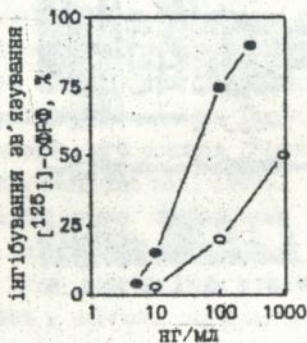


Рис. 15. Зв'язування [^{125}I]-ОФРФ з мозку бика зі специфічними рецепторами клітин лінії Swiss-3T3 у присутності неміченого ОФРФ з мозку бика (●) і ОФРФ в'юна (○)

цифічних рецепторів клітин-мішеней.

Встановлено, що клітини зародків в'юна також здатні специфічно зв'язувати [125 I]-сФРФ (рис. 16). Насичення центрів зв'язування ФРФ цих клітин досягається при концентрації радіоактивного міченого фактора росту, рівній 15 нМ у розрахунку на 10^6 клітин. Це відповідає даним, які були отримані при подібному дослідженні клітин зародків амфібій *X. laevis* (Slack et al., 1989). У присутності 100-кратного надлишку неміченого сФРФ зв'язування [125 I]-сФРФ клітинами зародків в'юна практично відсутнє, що свідчить про високу специфічність центрів зв'язування ФРФ.

Графік, побудований у координатах Скетчарда на підставі цих даних, вказує на існування на поверхні клітин зародків в'юна одного класу високоафінних центрів зв'язування (рис. 17). Кількість таких центрів становить приблизно 83 тис. у розрахунку на одну клітину зародка. Це відповідає кількості рецепторів ФРФ у плазматичних мембранах нормальних клітин осавців, де у залежності від типу клітини нараховується 20-100 тис. рецепторів ФРФ на клітину (Gospodarowicz et al., 1987; Burgess, Maciag, 1989).

Ув'яна константа дисоціації (K_d) для взаємодії цих рецепторів з сФРФ становить 1.2 нМ. Ця величина дещо перевищує значення K_d , розраховане для високоафінних рецепторів ФРФ клітин осавців. Так, показано, що під час взаємодії таких рецепторів з кислим ФРФ Іх K_d становить 50-500 пМ, а під час взаємодії з сФРФ - 20-200 пМ (Schreiber et al., 1985; Kan et al., 1988; Kurckawa et al., 1989; Mansson et al., 1989). Відносно низьку спорідненість до ліганду рецепторів ФРФ клітин зародків в'юна можна пояснити структурними особливостями цих рецепторів у порівнянні з рецепторами ФРФ у клітинах осавців. Ці особливості можуть вумовлювати вищу спорідненість відповідних рецепторів клітин зародків в'юна по відношенню до ендогенних ФРФ-подібних факторів росту, як це було показано раніше для ЕФР-подібних поліпептидів (Mesiano et al., 1985).

На підставі отриманих результатів можна зробити висновок, що клітини зародків в'юна на стадії пізньої бластули містять ФРФ-подібні фактори росту, та високоафінні рецептори, здатні зв'язувати ці фактори. Отже, у клітинах зародків в'юна існує регуляторна

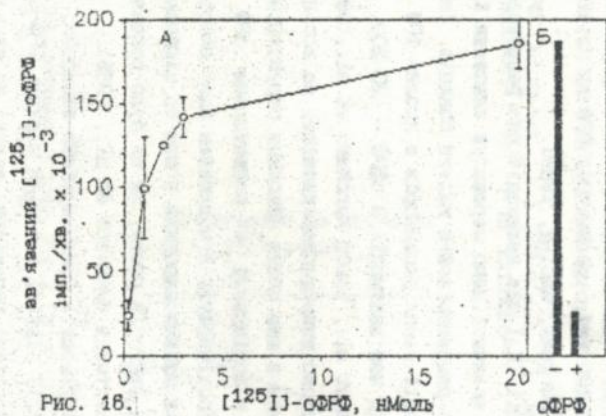


Рис. 16.

$[^{125}\text{I}]\text{-OFRF}$, нмоль

OFRF

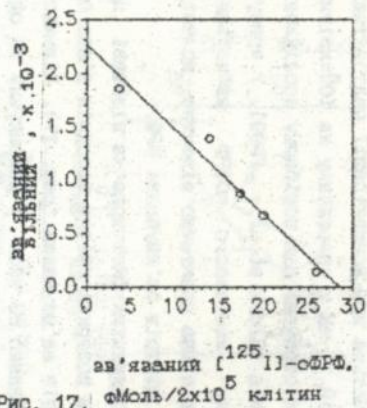


Рис. 17.

зв'язаний $[^{125}\text{I}]\text{-OFRF}$, нмоль / 2×10^5 клітин

Рис. 16. А. Специфічне зв'язування $[^{125}\text{I}]\text{-OFRF}$ клітинами зародків в'юна; В. Інгибування зв'язування $[^{125}\text{I}]\text{-OFRF}$ клітинами зародків в'юна у присутності (+) 100-кратного надлишку неміченого OFRF

Рис. 17. Графік Скетчарда для даних, отриманих під час дослідження специфічного зв'язування $[^{125}\text{I}]\text{-OFRF}$ клітинами зародків в'юна

система, у якій задіяний ФРФ, і ця система може приймати участь у контролі процесів, що відбуваються під час ембріонального розвитку риб.

Ключова роль факторів росту з родини ФРФ у процесах індукції утворення мезодерми була вперше виявлена під час вивчення молекулярних механізмів регуляції ембріонального розвитку амфібій *X.laevis* [Slack et al., 1987]. Згідно до трисигнальної моделі індукції утворення мезодерми, ці фактори росту забезпечують виникнення вентрального сигналу [Kimelman, Kirshner, 1988; Woodland, Jones, 1988]. Можна припустити, що ФРФ виконує подібну роль і в процесах індукції утворення мезодерми в ембріоні риб. На користь такого припущення свідчать також дані про виявлення у зародках в'яна на ранніх стадіях розвитку факторів росту з властивостями ТФР- β [Федишин та ін., 1990]. Встановлено, що ТФР- $\beta 2$ приймає участь у формуванні дорезального сигналу під час індукції утворення мезодерми в ембріонах *X.laevis* [Kimelman, Kirshner, 1987]. Отже, отримані нами результати свідчать про те, що ФРФ-подібні фактори росту можуть відігравати важливу роль у регуляції процесів розвитку ембріонів не лише амфібій, птахів і соавців, але й костистих риб.

ВИСНОВКИ

1. Клітини зародків костистої риби в'юна (*Misgurnus fossilis* L.), ізольовані на стадії пізньої бластули, містять фактор(и) росту, подібний до ФРФ. Цей фактор(и) виділено та частково очищено. Його біологічна активність інгібується специфічними антитілами проти оФРФ з мозку бика.

2. За мітогенною активністю ФРФ в'юна подібний до оФРФ з мозку бика. Він дозволяє стимулювати включення [³H]-тимідину в ДНК фібробластів ліній NIH-3T3, Swiss-3T3 та фібробластів ембріонів людини.

3. ФРФ в'юна і оФРФ викликають подібні зміни у метаболіах клітин-мішеней: стимулюють транспорт іонів Ca²⁺ у клітини, посилюють поглинання клітинами глюкози, індукують зростання активності S6-кінази у клітинах.

4. ТФР-β інгібує суботратнезалежний ріст клітин лінії CHO-719, індукований ФРФ з клітин зародків в'юна або оФРФ з мозку бика. Інсулін, навпаки, посилює такий ріст клітин лінії CHO-719, індукований ФРФ в'юна, або оФРФ бика.

5. Гепарин не лише підвищує здатність ФРФ в'юна стимулювати біосинтез ДНК у клітинах-мішенях, але й захищає цей фактор росту від теплової інактивації.

6. ФРФ з клітин зародків в'юна використовує спільні з оФРФ соавців специфічні рецептори клітин соавців.

7. Клітини зародків в'юна, ізольовані на стадії пізньої бластули, специфічно зв'язують [¹²⁵I]-оФРФ. Аналіз, проведений з використанням координат Скетчарда, вказує на існування одного клауу центрів зв'язування ФРФ у кількості 8.3×10^4 на клітину при K_d 1.2 нМ.

8. ФРФ здійснює регуляторні функції під час ембріонального розвитку костистих риб, оскільки клітини їхніх зародків містять цей фактор росту та його специфічні рецептори.

СПИСОК РОБІТ, ОПУБЛІКОВАНИХ ПО ТЕМІ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Stoika R.S., Sushel'nitskii S.I., Yakimovich I.A., Fedishin Ya.Ya., Kusen' S.I. The factors with the properties of transforming growth factor- β and fibroblast growth factor in the early loach embryos // Abstr. Soviet-Finnish Symposium on Developmental Biology "Signal molecules and cell differentiation", Suzdal' (1991). - Онтогенез. - 1991. - т.22, N 4. - с.407.

2. Якимович І.А., Стойка Р.С., Кусень С.И. Виявлення та характеристика речовин з властивостями фактора росту фібробластів у клітинах зародків костистої риби в'юна // VI Український біохімічний з'їзд. Тези доповідей. Ч.1. - Київ.: УСГА, 1992. - с.236.

3. Якимович І.А., Стойка Р.С. Изучение биологических свойств фактора роста фибробластов из клеток зародышей костистой рыбы в'юна // Тезисы совещания "Биология клетки в культуре", Санкт-Петербург (1992). - Цитология. - 1992. - т.34, N 9. - с.122-123.

4. Якимович І.А., Стойка Р.С., Кусень С.И. Выявление и характеристика веществ со свойствами фактора роста фибробластов в клетках зародышей в'юна // Онтогенез. - 1992. - т.22, N 3. - с.237-241.

5. Якимович І.А., Стойка Р.С., Кусень С.И. Влияние основного фактора роста фибробластов и его сочетаний с трансформирующим фактором роста типа β и инсулином на субстрат-независимую пролиферацию клеток линии СНО-719 из яичников китайского комьячка // Экспериментальная онкология. - 1993. - т.15, N 4. - с.59-61.

6. Сушельницкий С.И., Якимович І.А., Стойка Р.С., Кусень С.И. Синергизм стимулирующего влияния трансформирующего фактора роста β и инсулина на субстратнезависимую пролиферацию клеток линии СНО-719 // Цитология. - 1993. - т.35, N 8. - с.47-51.

ВЫДЕЛЕНИЕ, ОЧИСТКА И БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА
ФАКТОРА РОСТА ФИБРОБЛАСТОВ ИЗ КЛЕТОК ЗАРОДЫШЕЙ ВЬЮНА
MISGURNUS FOSSILIS L.

Резюме

Показано, что полипептидные вещества, экстрагированные и очищенные из клеток зародышей вьюна, изолированных на стадии поздней бластулы, обладают свойствами, характерными для фактора роста фибробластов (ФРФ). Их молекулярная масса, определенная с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия, составляет 15-16 кДа. Эти вещества связываются гепарин-сефарозой и инактивируются антителами против основного ФРФ вьюна. Они индуцируют синтез ДНК в мышечных фибробластах линий NIH-3T3 и Swiss-3T3, а также в фибробластах эмбрионов человека в условиях их роста в монослойной культуре. ФРФ-подобные факторы роста из клеток зародышей вьюна стимулируют суботратнезависимую пролиферацию клеток линии CHO-719 из яичника китайского хомячка в полужидкой культуральной среде, содержащей 0.33 % агара. Обнаружено, что клетки зародышей вьюна имеют центры специфического связывания [125 I]-ФРФ. Полученные результаты свидетельствуют о том, что ФРФ-подобные факторы роста могут выполнять важные регуляторные функции не только в эмбрионах млекопитающих и амфибий, но также и в эмбрионах костистых рыб.

THE DETECTION, PURIFICATION, AND BIOLOGICAL PROPERTIES
OF FIBROBLAST GROWTH FACTOR FROM THE EMBRYONIC CELLS OF THE
LOACH *MISGURNUS FOSSILIS L.*

Summary

The polypeptide substances which had been extracted and purified from the cells of the loach embryos at the late blastula stage were shown to possess the properties characteristic for the fibroblast growth factor (FGF). Their molecular weight is 15-16 kDa (according to SDS-PAAG electrophoresis). They bind with heparin-sepharose and are inactivated with the antibodies against bovine basic FGF. They induce DNA synthesis in NIH-3T3 and Swiss-3T3 lines of mouse fibroblasts and in human embryonic fibroblasts grown in monolayer culture. The anchorage-independent proliferation of chinese hamster ovary cells of CHO-719 line grown in the semisolid culture medium which contained 0.33 % agar is also stimulated by FGF-like growth factors from the loach embryonic cells. The sites which can specifically bind [125 I]-basic FGF were detected in these cells. The obtained results allow to consider that FGF-like growth factors can play an important regulatory role not only in the mammalian and amphibian embryos but also in the embryos of the teleost fishes.

Підписано до друку 30.12.93. Формат 60×84/16. Друк офсет. Папір офсетний. Умовн. друк. арк. 1,4. Умовн. фарбо-відб. 1.62. Обл.-вид. арк. 1,34. Тираж 100 прим. Зам. 3496.

Обласна книжкова друкарня, 290000, Львів. вул. Стефаника, 11.

459341

AB 29.140

AB 29.140