

УДК 57.053:576.535

СИСТЕМЫ ВТОРИЧНЫХ МЕССЕНДЖЕРОВ В РЕГУЛЯЦИИ
НЕЙРОНАЛЬНОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ
И НЕЙРОСЕКРЕЦИИ

КОНДРАТЬЕВ А. Д., °СЕВЕРИН С. Е., °МОСКВИТИНА Е. Л.,
ПОСЫПАНОВА Г. А., ГУБИН А. И., ЮСУПОВА Р. А., ТУСУПОВ О. К.,
ШМЫРЕВ И. И., ЗОТОВА Е. Е.

Научный центр молекулярной диагностики,

*Институт диабета, Москва.

В работе рассматриваются системы вторичных мессенджеров, опосредующих нейрональную дифференцировку, индуцированную фактором роста нервов, а также регуляторные механизмы, участвующие в процессе секреции нейромедиаторов. С помощью селективных ингибиторов протенинкиназ исследована возможная роль этих ферментов в индукции роста нейритов. Показано, что потенциация этого процесса может быть связана с активацией аденозиновых рецепторов. С помощью окрашивания актина ТРИТЦ-фаллоидином была подтверждена функциональность процесса нейритогенеза, индуцированного прямым модулированием активности различных систем вторичных мессенджеров.

Развитие и нормальное функционирование НС во многом определяется полипептидными факторами роста. К числу факторов, влияющих на нервные клетки, относятся фактор роста нервов (ФРН) [1], фактор роста фибробластов (ФРГ) [2], эпидермальный фактор роста (ЭФР) [3] и ряд других белков. При изучении нейрональной дифференцировки в культуре клеток одним из основных критериев оценки этого процесса является рост нервных отростков. Биохимический механизм, регулирующий этот процесс, в настоящее время не ясен. Удобной моделью для исследований дифференцировки нервных клеток является линия феохромоцитомы РС12 [4], отвечающая на действие ФРН и ФРФ ростом нейритов и приобретающая целый ряд свойств симпатического нейрона.

В последнее время получен ряд данных, указывающих на участие в регуляции дифференцировки нервных клеток целого комплекса протенинкиназ (ЕС 2.7.1.37). В частности, ФРН вызывает изменения в активностях протенинкиназы С [5, 6], сАМР-зависимой [6] и Ca^{2+} -кальмодулинзависимой протенинкиназы [7]. Ингибитор протенинкиназы К-252а блокировал ФРН-зависимый рост нейритов у клеток РС12 [8, 9] и у симпатических ганглиев [10]. Таким же действием обладал ингибитор протенинкиназы С (ПКС)—сфингозин

[11], а активатор этого фермента—12-о-тетрадекацилфорбол 13-ацетат (ТРА) оказывал противоположное действие [12]. В то же время, клетки РС12, дефицитные по ПКС за счет отрицательной регуляции, сохраняли способность к образованию нейритов под действием ФРН [13]. Ингибитор ПКС и сАМР-зависимой протенинкиназы Н7 [14] стимулировал нейротрофное действие ФРФ и ЭФР в первичных культурах нервных клеток мозга крысы [3].

Имеющиеся в литературе данные не позволяют идентифицировать тип протенинкиназы, ответственной за индукцию роста нейритов. Поскольку действие Н7 на клетки феохромоцитомы РС12 исследовано не было, мы изучили его влияние на их морфологию и способность модулировать индукцию роста нейритов фактором роста нервов.

Для определения влияния Н7 на морфологическую дифференцировку клеток феохромоцитомы РС12 это вещество вводили в культуральную среду в концентрации 50 мкМ либо без ФРН, либо одновременно с ФРН (1,9 нМ). После инкубации в течение 24 ч клетки фиксировали и определяли индекс клеток с нейритами (Ni), выраженный в процентах от общего числа клеток. Было обнаружено, что Н7 сам по себе не вызывал сколько-нибудь заметных изменений величины Ni. Следует, однако, отметить, что Н7 индуцировал вырост нейритоподобных отростков в течение 1 ч после начала инкубации, которые пропадали к 24 ч. Инкубация клеток РС12 с Н7, введенным в культуральную среду вместе с ФРН, приводила к резкому усилению нейритизации клеток. Величина Ni достигала в этом случае $78 \pm 2\%$, в то время как инкубация только с ФРН давала Ni, равный $53 \pm 3\%$.

Полученные данные свидетельствуют о том, что ингибитор протенинкиназы С способен потенцировать нейритстимулирующий эффект ФРН. В работе Reinhold, Neel [13] было показано, что клетки, объединенные протенинкиназой С после длительной инкубации с фоболовым эфиром, продолжали отвечать на ФРН индукцией роста нейритов. Это свидетельствует о том, что либо мишенью действия Н7 в клетках РС12 служит какая-либо иная протенинкиназа, опосредующая ФРН-зависимую индукцию роста нейритов, либо Н7 нарушает общий протенинкиназный баланс этих клеток. Возможно, что обе эти причины действуют одновременно. Известно, что Н7 способен ингибировать также и протенинкиназу А. Нам удалось получить данные о том, что вещества, влияющие на аденилатциклязную систему, могут вызывать эффекты, похожие на действие Н7.

В частности, нами было исследовано влияние производных аденозина (АТР, АДР, АМР и аденозина) на морфологию клеток РС12 и способность ФРН индуцировать их дифференцировку. При добавлении аденозина и его производных к клеткам РС12 у большей части клеток через короткий промежуток времени (около 1 ч) наблюдался рост нейритов. Число клеток с нейритами уменьшалось к

концу первых суток инкубации с АТР, АДФ, АМР и аденозином аналогично тому, как это происходило в случае Н7.

Инкубация клеток с GTP или Vt_2 cGMP не вызывала нейритизации. Было замечено, что нейритизация, вызываемая АТР, в большой степени зависит от концентрации ионов Mg. Нами было высказано предположение о том, что действующим началом при добавлении в среду производных аденозина является сам аденозин, который, очевидно, появляется в среде под действием ферментов сыворотки и, возможно, эктонуклеотидаз плазматической мембраны самих клеток. Для проверки этого предположения мы добавляли в культуральную среду, наряду с аденозином или АТР, дипиридамо, являющийся ингибитором транспорта аденозина в клетку [15]. Дипиридамо в концентрации 10 мкМ значительно пролонгировал нейритизацию, вызванную этими реагентами. Поскольку на клетках РС12 были показаны рецепторы аденозина типа А2, можно предположить, что наблюдаемые эффекты связаны с аденилатциклазной системой.

Для оценки функциональности индукции нейритоподобных отростков в течение 1 ч инкубации с указанными модуляторами с системой вторичных мессенджеров был использован метод окрашивания клеток РС12 ТРИТЦ-фаллоидином. Увеличение окрашивания клеток этим реагентом свидетельствует о перераспределении активного цитоскелета и характерно для действия ФРН [16]. Нами показано, что ранняя нейритизация, вызванная производными аденозина, сопровождается аналогичной реорганизацией актина. Похожие результаты были получены и в случае обработки клеток Н7 и ФРН+Н7.

Участие ПКС в выполнении важнейших специализированных функций нейронов было неоднократно показано на клетках РС12. Ранее была продемонстрирована связь ПКС с регуляцией секреции нейромедиаторов. С этим же процессом связана, вероятно, ее способность фосфорилировать тирозингидроксилазу—ключевой фермент синтеза ряда нейротрансмиттеров [17]. Транслокация ПКС из цитозоля на клеточную мембрану, сопровождающая активацию данного фермента, была показана на клетках РС12 под действием агонистов мускариновых ацетилхолиновых рецепторов [18] и эфиров форбола [13]. Способность ФРН индуцировать транслокацию ПКС в клетках РС12 ранее не исследовалась и стала одной из целей данной работы. Нами была изучена активность ПКС в цитоплазматической и мембранной фракциях клеток РС12 после их инкубации с ФРН.

Для определения активности ПКС к клеткам РС12 добавляли эффекторы и инкубировали 15 или 60 мин. По окончании инкубации клетки снимали с субстрата, гомогенизировали, разделяли цитоплазматическую и мембранную фракции и определяли протеникиназную активность. На рис. 1, а приведены результаты измерения активности ПКС в цитозольной фракции клеток РС12 после 15 мин инкубации с ФРН и ТРА в концентрации 1,9 нМ и 0,1 мкМ соответственно. Из данных, представленных на рис. 1, а, видно, что под

действием и ФРН, и ТРА наблюдалось некоторое повышение активности ПКС. ФРН вызывал активацию фермента на $118 \pm 4\%$ по сравнению с контрольными клетками, а ТРА—на $131 \pm 8\%$.

В связи с тем, что мы показали резкое усиление нейрестимулирующей активности ФРН в присутствии Н7, было исследовано влияние этого вещества на ФРН-индуцированные изменения активности ПКС. Оказалось, что совместная инкубация клеток РС12 с Н7 и ФРН приводила к исчезновению активирующего эффекта ФРН в цитозоле (рис. 1, а). Существенных отличий в характере и ин-

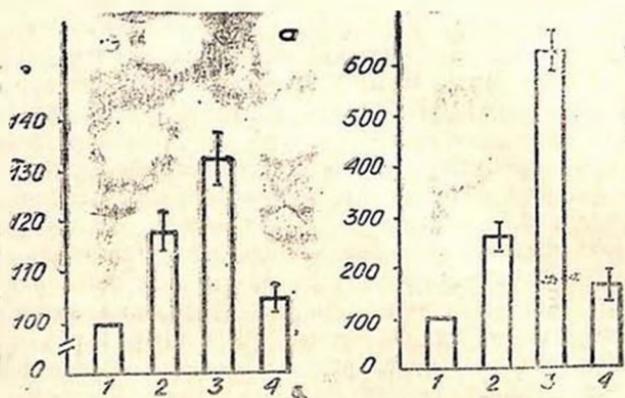


Рис. 1. а—влияние ТРА (2), ФРН (3) и ФРН + Н7 (4) на активность протенинказы С в цитозольной фракции клеток РС12. Активность ПКС в контроле (1) составила 14500 ± 270 имп/мин на мг белка. По оси ординат—активность ПКС (%); б—влияние ТРА (2), ФРН (3) и ФРН + Н7 (4) на активность протенинказы С в мембранной фракции клеток РС12. Активность ПКС в контроле (1) составила 9789 ± 120 имп/мин на мг белка. По оси ординат—активность ПКС (%).

тенсивности эффектов ТРА, ФРН и Н7 + ФРН между 15 и 60 мин инкубации не наблюдалось. Следует отметить, что в цитозоле ПКС находится в неактивном состоянии из-за отсутствия кофакторов. Таким образом, наблюдаемое в случае ТРА и ФРН повышение активности не является следствием активации *in vivo*, а происходит за счет добавления экзогенных кофакторов *in vitro*, в процессе постановки ферментативной реакции. Возрастание активности в данном случае может быть объяснено увеличением количества фермента в цитозольной фракции, происходящим под действием примененных нами эффекторов.

На рис. 1, б приведены данные измерения активности ПКС в мембранной фракции клеток РС12, обработанных теми же эффекторами. Показано, что под действием ФРН и ТРА наблюдалось резкое повышение активности ПКС (в 2,6 и 6,2 раза соответственно). Н7, который стимулировал ФРН-индуцированный рост нейритов, практически полностью блокировал вызванную ФРН активацию

ПКС в мембранах (рис. 1, б). Как и в цитоплазме, различий между 15 мин и 1 ч инкубации клеток с эффекторами не наблюдалось.

Полученные данные об активности ПКС в мембранной фракции клеток РС12 свидетельствуют о том, что ФРН вызывает транслокацию ПКС из цитоплазмы в мембрану, что является характерным признаком активации данного фермента, происходящей *in vivo*. Вместе с тем, нами было обнаружено некоторое повышение активности ПКС в цитоплазме после обработки клеток ФРН, что совпадает с результатами Напа и соавт. [5]. В сочетании с данными об активности фермента в мембранной фракции это указывает на возможную быструю стимуляцию биосинтеза ПКС под действием ФРН. Аналогичный эффект наблюдался и в присутствии ТРА, что может быть свидетельством регуляции этого процесса самой ПКС по механизму обратной связи. Обращает на себя внимание практически полная блокада ФРН-индуцированного повышения активности ПКС ее ингибитором Н7, который обладает мощной нейрестимулирующей активностью именно в сочетании с ФРН как в мембране, так и в цитозоле. Одно из этих явлений—блокада активации в мембране или накопления ПКС в цитозоле, возможно, и ответственно за нейрестимулирующее действие Н7. Не исключено, что обе причины действуют одновременно.

Известно, что ПКС в ассоциации с фосфолипидами и ионами кальция является рецентром форболовых эфиров [19]. Поэтому форбол 12, 13-дibuтират ($[^3\text{H}]\text{PDBu}$) часто используется для оценки концентрации ПКС в различных тканях, а также для определения ее внутриклеточной локализации. Данные, полученные с помощью определения активности, показали, что в клетках РС12 наблюдается транслокация ПКС под действием форболовых эфиров и ФРН. Для подтверждения этого эффекта мы использовали метод связывания $[^3\text{H}]\text{PDBu}$ с клетками РС12. Кроме того, определение ферментативной активности не отвечает на вопрос, чем вызван эффект Н7—ингибированием активности ПКС или блокадой транслокации?

Клетки РС12 обрабатывали ФРН, Н7 и ФРН + Н7 в течение 5 и 15 мин. Нами показано, что при инкубации контрольных клеток РС12 с $[^3\text{H}]\text{PDBu}$ специфическое связывание составляло $2,25 \pm 0,5$ пмоль/мг белка после инкубации клеток в течение 15 мин с ФРН. Добавление в инкубационную среду Н7 в концентрации 50 мкМ, индуцирующей вместе с ФРН максимальный рост нейронов, полностью снимало стимулирующий эффект ФРН.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о способности фактора роста нервов увеличивать связывание форболового эфира с протеникиназой С, что принято считать доказательством ее транслокации на мембрану. Эти данные подтверждают результаты определения активности этого фермента в мембранной и цитоплазматической фракциях клеток феохромоцитомы РС12. Блокада связывания $[^3\text{H}]\text{PDBu}$ Н7 указывает на способность этого соединения

ингибировать именно процесс транслокации протеникиназы С, а не только активность данного фермента.

Одним из наиболее наглядных методов детектирования транслокации ПКС в мембрану является электроблоттинг. Клетки РС12 инкубировали с ТРА (0,1 мкМ), ФРН (1,9 нМ) и ФРН+Н7 (50 мкМ), разрушали и разделяли мембранную и цитозольную фракции. После электрофоретического разделения белков цитозольной и мембранной фракции клеток осуществляли их электроперенос на нитроцеллюлозу и последующее окрашивание моноклональными антителами к ПКС. Применение данного метода дает возможность не только визуализировать транслокацию, но и исключить интерпретацию результатов метода связывания форболового эфира, указывающую на возможность повышения сродства [32]РДВн к ПКС под действием ФРН.

Процесс транслокации ПКС, индуцированный ТРА хорошо изучен, в том числе и с помощью метода иммуноблоттинга. Нами было проведено исследование временной зависимости этого процесса на клетках РС12 и сравнение его с эффектом ФРН. Показано, что в контрольных клетках РС12 ПКС детектировалась и в цитозольной, и в мембранной фракциях. Под действием ТРА происходило увеличение количества ПКС в мембранной фракции клеток РС12 уже через 5 мин (в 1,7 раза). Через 15 мин увеличение достигало максимального значения (в 3,4 раза по сравнению с контролем) и существенно не изменялось в течение последующих 45 мин. Повышение содержания протеникиназы С в мембранной фракции сопровождалось соответствующим ее уменьшением в цитозоле. Эффект ФРН был аналогичен действию ТРА как в мембранах, так и в цитозоле. Н7 при совместной инкубации с ФРН полностью блокировал влияние фактора.

Подтвердив наличие транслокации ПКС в клетках РС12 под действием ФРН, метод иммуноблоттинга не позволил обнаружить увеличение количества ПКС в цитозоле под действием как ТРА, так и ФРН, на что указывало измерение активности. Вероятно, такое различие связано с тем, что ПКС существует в виде трех изоформ— α , β и γ . Антитела, которые мы применяли для иммуноблоттинга, направлены против изоформ α и β . Возрастание активности в цитозоле может быть связано с увеличением количества γ изоформы, которая не детектируется используемыми антителами.

В работе Ehrlich и соавт. [20] было показано, что на поверхности нервных клеток детектируется протеникиназная активность. Предполагаемыми субстратами этой протеникиназы служат белки клеточной адгезии. Поскольку индукция роста нейритов предполагает значительные изменения на поверхности клеток РС12, нами ранее был предпринят поиск поверхностной протеникиназы (эктопротеникиназы) и показано ее наличие в этих клетках [21]. Мы решили исследовать не происходит ли при транслокации ПКС ее

экспонирования во внеклеточное пространство. Для решения этой задачи мы использовали проточную цитофлуориметрию.

Проточный цитофлуориметр дает возможность детектировать наличие антигена на внешней поверхности мембраны. Моноклональные антитела к ПКС, конъюгированные с ФИТЦ, добавляли

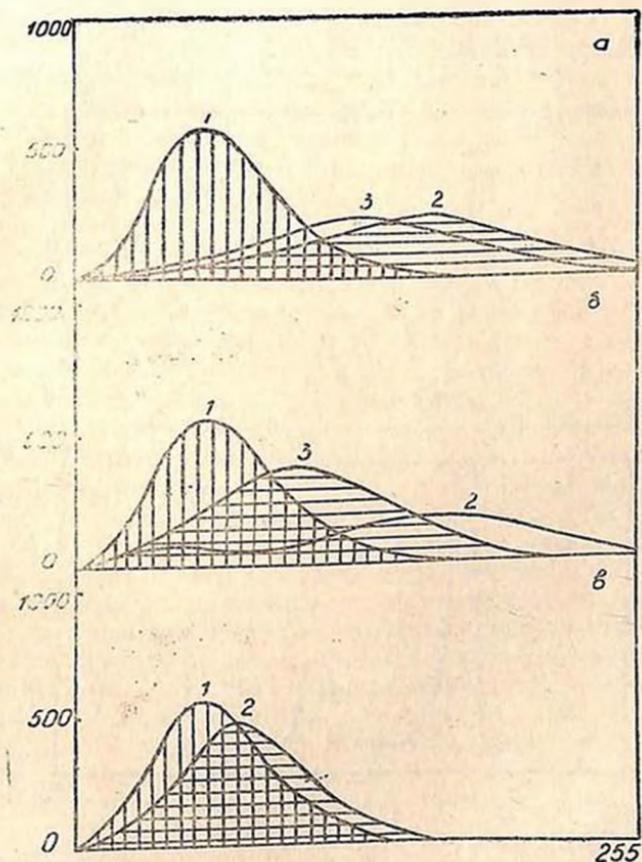


Рис. 2. Интенсивность флуоресценции клеток РС12, меченных моноклональными антителами к протеникиназе С, без обработки эффекторами (1) и после обработки: а—ТРА в течение 15 мин (2) и 60 мин (3); б—ФРН (2) и ФРН + Н7 (3) в течение 15 мин; в—Н7 в течение 15 мин (2). По оси абсцисс—интенсивность флуоресценции (отнесенные единицы). По оси ординат—число клеток.

клеткам РС12, обработанным эффекторами. После инкубации и соответствующих промывок клетки анализировали на проточном цитофлуориметре EPICS C. После 15 мин инкубации клеток с ТРА концентрации 0,1 мкМ наблюдалось увеличение связывания с ними ФИТЦ-меченых моноклональных антител. Результаты этого экспери-

мента представлены на рис. 2, а. Из данных, приведенных на рисунке, видно, что обработка ТРА увеличивала флуоресценцию клеток с 41 относительной единицы до 165. Через 60 мин эффект несколько уменьшался (до 145 относительных единиц). Аналогичное увеличение происходило и в случае обработки клеток ФРН в концентрации 1,9 нМ (рис. 2, б). Н7 в концентрации 50 мкМ сам по себе не оказывал никакого влияния (рис. 2, в), а в комбинации с ФРН полностью блокировал его действие (рис. 2, в). В ходе дан-

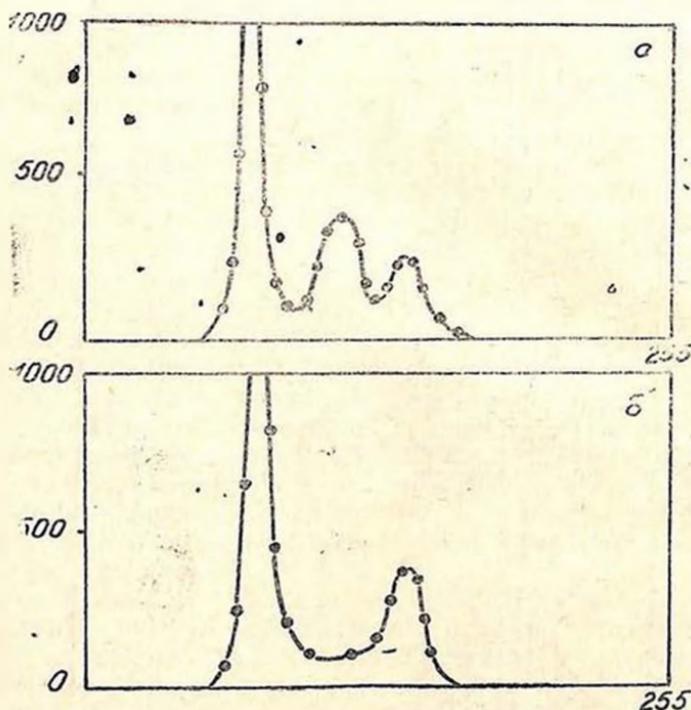


Рис. 3. Распределение клеток PC12 по стадиям клеточного цикла при плотности посева 0,5 млн (а) и 1,5 млн (б) клеток на чашку. Петри диаметром 6 см. Окрашивание бромистым этидием. По оси абсцисс—содержание ДНК (интенсивность флуоресценции в относительных единицах). По оси ординат—число клеток.

ного эксперимента, однако, наблюдалось разрушение большого числа клеток (до 80%), что связано, вероятно, с условиями инкубации (в присутствии азиды натрия) и механическим снятием клеток с субстрата.

Таким образом, транслокация ПКС была подтверждена и с помощью проточной цитофлуориметрии. Полученные результаты, однако, не свидетельствуют об экспонировании ПКС во внесклеточное пространство. Следует отметить, что увеличение флуоресценции кле-

ток после обработки их ТРА и ФРН может быть объяснено не только транслокацией фермента и/или выходом антигена на внешнюю сторону мембраны, но и повышением, после воздействия данных эф- фекторов, сродства ФИТЦ-меченых антител к ПКС, проникших в разрушенную клетку. Однако, принимая во внимание данные имму- ноблоттинга, показавшие количественные изменения содержания ПКС в цитозоле и мембранах, а также результаты связывания [^3H]РДВи и определения ферментативной активности, можно предположить, что эффект, наблюдаемый на EPICS C, вызван увеличением кол- чества ПКС в мембранах клеток РС12 после обработки ТРА и ФРН. Цитоплазматическая ПКС, скорее всего, вымывается при про- мывках клеток в ходе эксперимента.

При проведении данных экспериментов была обнаружена зави- симость эффекта транслокации С от плотности посева клеток РС12. Эффект лучше всего детектировался при плотности посева 0,5 млн клеток на чашку Петри диаметром 6 см. При увеличении плотности в 3 раза эффект полностью исчезал.

Ранее было показано, что ФРН действует на клетки РС12 в стадии клеточного цикла С1. Клетки, находящиеся в других стадиях цикла, проходят их и выходят из цикла в С1 [2]. Нами было ис- следовано распределение клеток РС12 по стадиям клеточного цикла в зависимости от плотности посева и связь этого распределения с наличием эффекта ФРН на транслокацию ПКС. Для этого клетки высаживали с плотностями 0,5 и 1,5 млн на чашки Петри диаме- тром 6 см. Через 12—14 ч после высадки клетки обрабатывали бро- мистым этидием и анализировали на проточном цитофлуориметре. На рис. 3 приведены гистограммы, отражающие распределение кле- ток по стадиям цикла в зависимости от плотности посева. Из дан- ных, приведенных на этих рисунках, видно, что клетки РС12, вы- сажённые с низкой плотностью (рис. 3, а), отличаются от клеток с высокой плотностью (рис. 3, б) наличием характерной популяции, на- ходящейся в S-фазе. Эта популяция составляет $21 \pm 0,5\%$ от всех клеток, что существенно превышает значения, присущие клеткам, высаженным с высокой плотностью ($13 \pm 2\%$). Через 6—8 ч пик в S-фазе переставал детектироваться. Одновременно с этим пропадало влияние ФРН на локализацию ПКС. Появление пика в S-фазе связано, вероятно, с частичной синхронизацией клеток, происходя- щей при пересеве и окончанием лаг-периода через 12—14 ч, то есть к моменту, когда определение распределения клеток по циклу ста- новится возможным методически. У клеток с высокой плотностью посева лаг-период длится, вероятно, меньше, и синхронное появле- ние популяции в S-фазе не детектируется используемым методом, поскольку появляется ранее 12 ч. Выдерживание клеток перед по- становкой эксперимента в течение не менее 12 ч после высадки не- обходимо для их нормального прикрепления к субстрату.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что ФРН оказывает влияние на транслокацию ПКС из цитозоля в

мембрану только в популяции феохромоцитомы РС12, обогащенной клетками в S-фазе. Эти результаты могут указывать на то, что ПКС, регулируемая ФРН, имеет отношение к клеткам РС12, интенсивно синтезирующим ДНК. Снижение пролиферативной активности под действием ФРН сопровождается индукцией роста нейритов. Действие И7, потенцирующее рост нейритов и полностью блокирующее при этом действие ФРН на ПКС, подтверждает участие этого фермента в регуляции пролиферации клеток РС12.

На основании полученных данных можно сделать вывод о способности ФРН оказывать влияние на ПКС и об участии этого фермента в регуляции пролиферативной активности клеток РС12. Кроме того, следует констатировать, что влияние ФРН на ПКС связано, по всей видимости, с S-фазой клеточного цикла. Стимуляция ФРН-индуцированного роста нейритов И7 связана, вероятно, с теми же причинами, которые вызывают этот эффект при блоке пролиферации γ -интерфероном, как это описано в работе Improtа и соавт. [22].

Важную роль играет ПКС и в регуляции секреции нейромедiators. Одним из ключевых белковых субстратов, участвующих в регуляции нейросекреции через белковое фосфорилирование, является синапсин I—нейроспецифический белок, впервые описанный Ueda, Greengard [23], локализованный в синаптических окончаниях нервных клеток. Установлено, что С1 ассоциирован с цитоплазматической поверхностью синаптических везикул и, по-видимому, выступает в качестве якоря для везикул, так как способен также связываться с белками цитоскелета [24].

В предыдущих работах [25, 26] мы показали, что нейроспецифический белок синапсин I, эффективно и специфически фосфорилируется не только сАМР-зависимой протеникиназой (ПКА) и Ca^{2+} -кальмодулинзависимой протеникиназой II (ПК II), о чем было известно из литературы [27], но и ПКС. Детальный молекулярный механизм кальмодулинзависимого фосфорилирования С1 был описан ранее в ряде статей [28—30]. В частности, было показано, что данная модификация приводит либо к ослаблению взаимодействия молекулы синапсина I с синаптической везикулой [29], либо к аутопротеолизу белковой молекулы [28], после чего освобожденная везикула сливается с пресинаптической мембраной и происходит нейросекреция. В то же время, факт ПКС-зависимого фосфорилирования С1 ранее упоминался в работе De Camilli, Greengard [31], однако физиологическая значимость данного процесса отрицалась.

В данном исследовании мы использовали гомогенный синапсин I из мозга человека. Исследование кинетики его фосфорилирования ПКС, а также сравнение данного процесса с ПК II-зависимым фосфорилированием показало, что максимальные скорости этих двух процессов практически не отличаются, а величина K_m для синапсина, фосфорилируемого ПКС, составляет 0,25 мкМ (в расчете на M_r С1, равную 80000 Д), что было сопоставимо и даже несколько ниже соответствующих величин K_m для других протеники-

наз, фосфорилирующих данный нейроспецифический белок [32, 33]. Это дало нам возможность предположить, что С1 является физиологическим субстратом также и для ПКС.

Ранее мы показали, что ПК С обладает более высоким сродством к фосфатидилнозиту, по сравнению с фосфатидилсерином при фосфорилировании гистона Н1 [34]. Поэтому представляется интересным исследование функциональной роли фосфоинозитидов, как модуляторов активности данного фермента.

Установив, как отмечалось выше, что чистые фосфолипиды являются эффективными активаторами ПКС-опосредованного фосфорилирования С1 [26], мы исследовали влияние одного из наиболее функционально активных соединений, участвующих в обмене фосфоинозитидов—фосфатидилнозит-4,5-дифосфата (ФИФ₂), а также диацилглицерина на степень активации данного процесса ФС и ФИ. При этом учитывалось реальное соотношение полифосфоинозитидов и диацилглицерина в мембранах нервных клеток [35].

Таблица

Активация ПКС-зависимого фосфорилирования синапсина I кислыми фосфолипидами

Константа активации мкг/мл	Липид	Липид + Ф.1Ф	Липид + ДСГ
K _a (ФИ)	1,1	0,2	0,6
K _a (+С)	0,8	0,6	0,4

Как видно из таблицы, при добавлении в инкубационную среду диацилглицерина происходило увеличение сродства фермента к фосфолипидам (ФИ и ФС) приблизительно в два раза. В то же время при добавлении в инкубационную среду ФИФ₂ (при концентрации 0,5 мкг/мл) в присутствии ФИ величина кажущейся константы активации (K_a) для ФИ уменьшается в пять раз: от 1,1 до 0,2 мкг/мл, а в случае ФС этот эффект не выражен.

Хорошо известно, что активации ПКС мембранными липидами предшествует увеличение концентрации внутриклеточного кальция и последующая транслокация фермента на мембрану [36]. Поскольку содержание ФС в мембранах нервных клеток в 2—3 раза выше, чем содержание ФИ [35], а также имеет место большее сродство ПКС к ФИ в присутствии как ФИФ₂, так и ДОГ, следует предположить, что ФИФ₂, наряду с диацилглицерином, может являться физиологическим активатором ПКС-зависимого фосфорилирования С1 в нервных клетках. Однако, если диацилглицерид будет модулировать активность ПКС при рецепторзависимом распаде фосфоинозитидов, ФИФ₂, в свою очередь, будет способен активировать ПКС в отсутствие гормонального сигнала.

Поскольку ранее нами было также показано, что процессы кальмодулин- и фосфолипидзависимого фосфорилирования С1 взаи-

мозависимы, то есть активаторы ПКС (жирные кислоты и кислые фосфолипиды) ингибируют модулируемое ПК II фосфорилирование, а кальмодулин—стимулятор ПК II подавляет зависимое от протеникиназы С фосфорилирование синапса I [26], можно предположить, что регуляция нейросекреции как *in vivo*, так и на уровне клеточных осуществляется путем одновременного запуска обеих систем Ca^{2+} -зависимого фосфорилирования.

SYSTEMS OF SECOND MESSENGERS MEDIATING PROCESSES OF NEURAL DIFFERENTIATION AND NEUROTRANSMITTER RELEASE

KONDRATYEV A. D., *SEVERIN S. E., *MOSKVIINA E. L., POSYPANOVA G. A., GUBIN A. N., YUSUPOVA R. A., TUSUPOV O. K., SHIMYREV I. I., ZOTOVA E. E.

Research Center of Molecular Diagnostics,
*Institute of Diabetes, Moscow.

Possible systems of second messengers, mediating NGF-induced differentiation of nerve cells and regulation of neurotransmitter release are discussed. Using selective protein kinase inhibitors the possible role of these enzymes in the induction of neurite outgrowth has been studied. The process of neurite outgrowth initiation has been shown to be rapidly potentiated by the activation of adenosine receptors. Using selective staining of actin, the process of neurite induction by the direct effect of protein kinase activity modulators has been shown to be as functional as in the case of NGF action.

ЛИТЕРАТУРА

1. Yankner B. A., Shooter E. M. *Ann. Rev. Biochem.*, v. 51, p. 845—868, 1982.
2. Rydel R. E., Greene L. A. *J. Neurosci.*, v. 7, p. 3639—2653, 1987.
3. Morrison R. S., Gross J. L., Moskale J. R. *Brain Res.*, v. 473, p. 141—145, 1988.
4. Greene L. A., Tishler A. S. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, v. 73, p. 2424—2428, 1976.
5. Hama T., Huang K.—P., Guroff G. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, v. 83, p. 2353—2357, 1986.
6. Cremins J., Wagner J. A., Hallegoua S. J. *Cell. Biol.*, v. 103, p. 887—893, 1986.
7. Nairn A. C., Nichols R. A., Brady M. J., Palfrey H. C. *J. Biol. Chem.*, v. 262, p. 14265—14272, 1987.
8. Hashimoto S. *J. Cell Biol.*, v. 107, p. 1531—1539, 1988.
9. Koizumi S., Contreras M. L., Matsuda Y., Hama T., Lazarovici P., Guroff G. *J. Neurosci.*, v. 8, p. 715—721, 1988.
10. Matsuda Y., Fukuda J. *Neurosci. Lett.*, v. 87, p. 11—17, 1988.
11. Hall F. L., Fernyhough P., Ishii D. N., Vulliamy P. R. *J. Biol. Chem.*, v. 263, p. 4460—4466, 1988.
12. Burstein D. E., Blumberg P. M., Greene L. A. *Brain Res.*, v. 247, p. 115—119, 1982.
13. Reinhold D. S., Neet K. E. *J. Biol. Chem.*, v. 264, p. 3538—3544, 1989.

14. *Hidaka H., Inagaki M., Kawamoto S., Sasaki Y.* Biochemistry, v. 23, p. 5036—5041, 1984.
15. *Richardson P. J., Browne S. J., Baillyes E. M., Luzio J. P.* Nature, v. 327, p. 232—234, 1987.
16. *Paves H., Neumar T., Metsis M., Saarna M.* FEBS Lett., v. 235, p. 141—143, 1988.
17. *Divirgilio F., Pozzan F., Wollheim C. B., Vincentini L. M., Me'dolesi J. J.* Biol. Chem., v. 261, p. 32—35, 1986.
18. *Messing R. O., Stevens A. M. J.* Neurosci., v. 9, p. 507—512, 1989.
19. *Nishizuka Y.* Nature, v. 308, p. 693—698, 1984.
20. *Ehrlich Y. H., Davis T. B., Bock E., Kordecki E., Lenox R. H.* Nature, v. 320, p. 67—69, 1989.
21. *Rudkin B. B., Lazarovici P., Levi B.—Z., Abe Y., Fujita K., Guroff G.* EMBO J., v. 8, p. 3319—3325, 1989.
22. *Improta T., Salvatore A. M., Di Luzio A., Romo G., Coccia E. M., Callisano P.* Exp. Cell Res., v. 179, p. 1—9, 1988.
23. *Ueda T., Greengard P. J.* Biol. Chem., v. 252, p. 5155—5163, 1977.
24. *Hirokawa N., Sobue K., Kanda K., Harada A., Yorifuji H. J.* Cell Biol., v. 103, p. 111—126, 1989.
25. *Severin S. E. (Jr.), Bykova E. V., Moskvitina E. L., Severin E. S. J.* Protein Chem., v. 8, p. 359—362, 1989.
26. *Severin S. E. (Jr.), Moskvitina E. L., Bykova E. V., Lutzenko S. V., Shvets V. I.* FEBS Lett., v. 259, p. 223—226, 1989.
27. *Nestler E. J., Greengard P.* Prog. Brain Res., v. 69, p. 323—339, 1986.
28. *Severin S. E. (Jr.), Moskvitina E. L., Gubin A. N., Kiselev V. I.* Adv. in Enzyme Regulation v. 29 (in press), 1991.
29. *Llinas R., McGuinness T. L., Leonard C. S., Sugimori M., Greengard P.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, v. 82, p. 3035—3039, 1985.
30. *Severin S. E. (Jr.), Moskvitina E. L., Bykova E. U., Lutzenko S. V., Shvets V. I.* Biologicheskie Membrany (Russ.), v. 7, p. 718—723, 1990.
31. *De Camilli P., Greengard P.* Biochem. Pharmacol., v. 35, p. 4349—4357, 1986.
32. *Vattano M. L.* Pharmacol., v. 37, p. 2381—2388, 1988.
33. *Nairn A. C., Greengard P. J.* Biol. Chem., v. 262, p. 7273—7281, 1987.
34. *Severin S. E. (Jr.), Tozmassyan E. K., Shvets V. I.* Biokhimiya (Russ.), v. 51, p. 1135—1139, 1989.
35. *Sastry P. S.* Prog. Lipid Res., v. 24, p. 69—176, 1985.
36. *Kikkawa U., Kitano T., Saito N., Fujiwara H., Nakanishi H., Kishimoto A., Taniyama K., Tanaka C., Nishizuka Y.* Prog. Brain Res., v. 69, p. 29—35, 1986.

Получена 23. II. 1991