

УДК 577.125+577.152.314:577.151.042

ПРОЦЕССЫ ДЕАЦИЛИРОВАНИЯ МЕМБРАННЫХ
ФОСФОЛИПИДОВ ПРИ ИНИЦИАЦИИ
ФОСФОИНОЗИТИДНОГО ЦИКЛА В СИНАПТОСОМАХ КРЫС
И ЛИМФОЦИТАХ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

ТАДЕВОСЯН Ю. В., АСАТРЯН Л. Ю., КАРАГЕЗЯН К. Г.

Институт молекулярной биологии НАН Армении, Ереван

Изучены связанные с инициацией фосфоинозитидного цикла (ФИ-цикл) процессы активации фосфоинозитидспецифичной ФДЭ (ФИ-ФДЭ) и деацилирования фосфатидилхолина (ФХ) в синаптосомах коры головного мозга крыс и лимфоцитах периферической крови человека (ЛПКЧ) под действием K^+ -деполяризации и конкаваллина А (КонА) соответственно. В обоих случаях обнаружена одноступенчатая, двухфазная динамика активации ФИ-ФДЭ в течение первой минуты инициации цикла. Выявлено коррелирующее с обнаруженной активацией ФИ-ФДЭ усиление процесса(ов) деацилирования фракции ФХ клеточных мембран, специфичное по отношению к ее жирнокислотному составу.

Ключевым звеном в функционировании ФИ-цикла — каскадного механизма, преобразующего внешние сигналы во внутриклеточные, является активация ФИ-ФДЭ, расщепляющей полифосфоинозитиды, преимущественно фосфатидилинозит-4,5-дифосфат (ФИ-4, 5-Ф₂), с образованием внутриклеточных вторичных посредников. Таковыми являются инозит-1,4,5-трифосфат (ИФ₃) и 1,2-диацилглицерин (ДАГ), вызывающие соответственно высвобождение внутриклеточного запасного кальция [1] и активацию протеникиназы С [2]. Образовавшийся ДАГ либо включается в процесс биосинтеза ФИ-4,5-Ф₂, либо подвергается поэтапному гидролизу с помощью ДАГ- и моноглицерид (МГ) липаз с образованием свободных жирных кислот (ЖК), в том числе и арахидоновой (АК), используемой для синтеза эйкозаноидов.

В настоящее время еще не полностью раскрыты молекулярные механизмы регуляции ФДЭ, активирующиеся вслед за лиганд-рецепторным взаимодействием или при воздействии на клетку различных внешних сигналов. В литературе [3] обсуждается участие регуляторных GTP-связывающих белков в процессах активации ФДЭ, однако, на наш взгляд, еще не совсем ясна природа передачи сигнала от рецептора к отмеченному усилительному ферменту через липидное микроокружение всех белковых молекул, участвующих в быстром этапе транслокации внешнего сигнала через ФИ-цикл.

Имеющиеся литературные данные [4, 5] позволяют предположить существование тесной взаимосвязи между локализацией, количественными изменениями отдельных фракций мембранных фосфолипидов (ФЛ), продуктами их гидролиза и процессами как передачи первичного сигнала через плазматическую мембрану (ПМ) клеток, так и формирования различных клеточных ответов. Отмеченные процессы должны осуществляться путем быстрых, обратимых и взаимосвязанных изменений активности широкого спектра ферментных систем обмена ФЛ, находящейся под регулирующим влиянием образующихся метаболитов, по принципу отрицательной обратной связи.

Целью настоящего исследования было изучение возможной кооперативной взаимосвязи между активацией ФИ-ФДЭ и процессами деацелирования мембранных ФХ синапсом коры головного мозга крыс и ЛПЧК при инициации ФИ-цикла K^+ -деполяризацией и митогенным лектином КоА соответственно. В течение нервов 60 с после действия внешних сигналов были изучены сдвиги в липидном метаболизме ПМ выщелоченных интактных клеточных популяций со встроенными в их мембраны мечеными ФИ и ФХ в качестве эндогенных субстратов указанных ферментных систем.

Материалы и методы

Эксперименты проводили на синапсом, выделенных по методу Hajos [6] из коры головного мозга белых беспородных крыс и ЛПЧК, полученных общепринятым методом [7] из крови здоровых доноров. Были использованы липидные стандарты и среды RPMI, Игла («Sigma» США), ионообменная смола Dowex IX8, HCOO⁻ форма, 200—400 меш («Serva», ФРГ), все радиоактивные соединения [$1-^{14}C$]АК (специфическая активность 56,6 мКи/ммоль), [$1-^{14}C$]олеоил-КоА (сп. актив. 52 мКи/ммоль), [$2-^3H$]инозит (сп. актив. 22,8 Ки/ммоль) фирмы «Amersham International, ple», (Англия).

Предварительное мечение клеток по 1 мКи [$1-^{14}C$]АК и [$1-^{14}C$]олеиновой кислоты (ОК) осуществляли известными методами [8, 9] в 5 мл 0,32 М сахараза—0,05 М трис-HCl буфера и среды Игла для инкубации синапсом и ЛПЧК соответственно. После инкубации в течение 1 ч при 37° суспензию клеток промывали 3 раза 15 мл забуференного раствора альбумина, свободного от ЖК (2 мг/мл).

Предварительное мечение ЛПЧК, суспендированных в среде RPMI 1640 (рН 7,4), с 20 мКи [$2-^3H$]инозита проводили в атмосфере O_2-CO_2 (95:5) в течение 3 ч при 37° с последующей 3-кратной промывкой средой инкубации, содержащей 5 мМ меченого инозита. Для установления метаболического равновесия и утилизации остатков невключенных меток разбавленные в соответствующих средах суспензии синапсом (1,5—2,0 мг белка/мл) и ЛПЧК (10^5 — 10^6 клеток/мл) проинкубировали в течение дополнительных 15—20 мин. Интактность клеток, определяемая окрашиванием трипано-вым синим, как правило, составляла более 90%.

Инициацию ФИ-цикла меченых синапсом проводили в вышеотмеченном 0,32 М сахараза—0,05 М трис-НСI буфере, содержащем 120 мМ К⁺, 3 мМ Na⁺, 2,5 мМ Са²⁺ и 150—200 мкг белка в конечном объеме 0,5 мл. Параллельно инкубировали контрольные пробы белка в той же буферной системе, содержащей 3 мМ К⁺, 120 мМ Na⁺ и по 5 мМ ЭГТА и ЭДТА. В таком же объеме среды Игла или RPMI осуществляли активацию ЛПЧК КоиА (2 мкг/мл).

На 0, 5, 10, 30 и 60 с после инициации цикла проводили экстракцию нейтральных липидов (НЛ) по Dole [10] и ФЛ по Bligh и Дугг [11], с дальнейшим их фракционированием методом ТСХ на фирменных («Merk», ФРГ) или приготовленных нами на основе силикагеля типа «Н» («Sigma», США) пластинках. Хроматографию НЛ проводили в системе растворителей петролейный эфир—диэтиловый эфир—муравьиная кислота (30:20:1), а ФЛ—в системах хлороформ-метанол-уксусная кислота-вода (25:15:4:2) или хлороформ-ацетон-метанол-уксусная кислота-вода (6:8:2:2:1). Фракционирование инозитфосфатов (ИФ) из водной фазы, полученной после экстракции липидов, проводили по Berridge [12]. Распределение радиоактивности в идентифицированных фракциях липидов определяли с помощью радиосканирующей установки («Berthold», ФРГ). Степень радиоактивности как отмеченных липидных фракций, так и элюатов, содержащих ИФ, измеряли в жидкости Брея на сцинтилляционном спектрометре («Roche-Bioelectronique», модель SL-4221, Франция). Статистическую обработку данных производили по Стьюденту.

Результаты и обсуждение

Трехкратная промывка суспензии предварительно меченных клеток забуференным альбумином не приводила к существенной потере радиоактивности, что свидетельствует о включении синтезированных меченых ФЛ в ПМ и находится в соответствии с существующими литературными данными [8]. Около 70% радиоактивности АК, включенной в общие ФЛ синапсом, было обнаружено (рис. 1, а) в двацильных формах фракций ФИ или ФХ в зависимости от наличия в инкубационной среде экзогенно добавленных 1-ацил-лизо-ФИ и 1-ацил-лизо-ФХ соответственно. Если при включении АК в ФИ синапсом наличие радиоактивности в остальных фракциях ФЛ практически не обнаруживалось, то при осуществлении аналогичной процедуры в отношении ФХ наблюдалось параллельное, примерно 10%-ное (от общей радиоактивности), включение метки во фракцию ФИ. Это происходит вследствие либо более быстрой обменяемости последних, либо в результате более вероятного присутствия в интактных синапсомах небольшого количества одного из эндогенных акцепторов АК-лизо-ФИ. Подобная закономерность избирательной, регулируемой модификации ЖК состава различных ФЛ фракций ПМ была обнаружена нами и в тимocyтах крыс. В отличие от указанных клеточных популяций, ЛПЧК обнаруживают более стабильный

метаболический статус липидного компонента ПМ в отношении включения и процентного распределения [^{14}C]ЖК. Было выявлено преимущественное включение исследованных ЖК во фракцию ФХ, независимо от наличия в инкубационной среде различных липопродуцирующих мембранных ФЛ (рис. 1, б). Следовательно, в зависимости

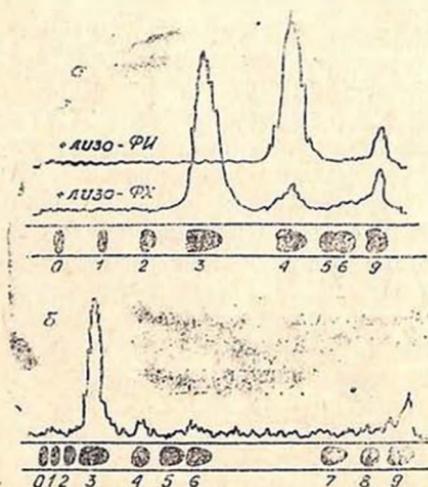
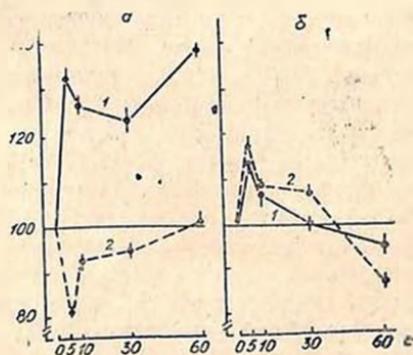


Рис. 1. Сканиграммы ТСХ полос фракционированных в системах растворителей: хлороформ-метанол-уксусная кислота-вода (25:15:4:2) (а) и хлороформ-ацетон-метанол-уксусная кислота-вода (6:8:2:2:1) (б) [^{14}C]-АК-меченных ФЛ синапсом и ЛПКЧ, соответственно. На схемах хроматограмм ФЛ фракции расположены в следующей последовательности: 0—старт, 1—лизо-ФХ, 2—сфингомиелин, 3—ФХ, 4—ФИ, 5—фосфатидилсерин, 6—фосфатидилэтаноламин, 7—фосфатидные кислоты, 8—дифосфатидилглицерин, 9—фронт

от функциональной активности и степени дифференциации, отдельные клеточные популяции характеризуются различной степенью чувствительности липидного бислоя к воздействию внешних модифицирующих факторов.

Рис. 2. Динамика изменения количества 1,2-ДАГ и свободной АК в условиях K^+ -деполяризации синапсом мозга крыс, содержащих 1-ацил-2- [^{14}C]-арахидонил-ФИ (а) и 1-ацил-2- [^{14}C]-арахидонил-ФХ (б). 1—1,2-ДАГ, 2—АК. Здесь и на рис. 3—6 за 100% приняты исходные уровни радиоактивности исследованных метаболитов в отсутствие активирующего внешнего сигнала



Изучение процесса инициации ФИ-цикла в синапсомемах, меченных 1-ацил-2- [^{14}C]-арахидонил-фосфоинозитидами, в условиях калиевой деполяризации выявило (рис. 2, а) 2-фазную динамику активации ФИ-ФДЭ с более чем 30%-ным (от исходного содержания) повышением уровня ДАГ уже на 5-й с активации клеток с последующим спадом до 30-й с и вторичным накоплением на 60-й с.

Обнаруженные сдвиги в содержании ДАГ—продукта диэстеразного расщепления АК-содержащих фосфоинозитидов коррелировали с понижением уровня свободной АК, что свидетельствовало о доминировании (особенно на 5-ой с активации цикла) процессов утилизации этой кислоты над ее высвобождением из фракций ФИ.

Исследование связанных с инициацией ФИ-цикла вышеотмеченных катаболических процессов в идентичных условиях эксперимента с использованием синапсом со встроенными в их мембраны 1-ацил-2-[1-¹⁴C]-арахидонил-ФХ позволило выявить через 5 с после действия внешнего сигнала почти 20%-ное повышение количества свободной АК (рис. 2, б) с последующим ее спадом до уровня нижеисходного (60 с). Примечательно, что динамика изменения количества АК до 30 с наблюдения четко коррелировала с динамикой активации ФИ-ФДЭ. Обнаруженное при этом некоторое увеличение уровня ДАГ, на наш взгляд, можно объяснить как следствие активации ФИ-ФДЭ, действующей на ФИ, включившие отмеченную выше 10%-ную радиоактивность АК.

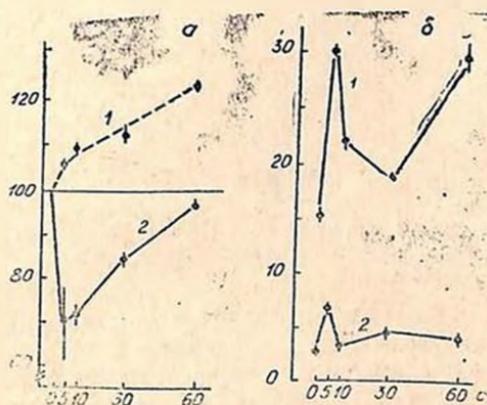


Рис. 3. а. Сдвиги в содержании [1-¹⁴C]-ОК и [1-¹⁴C]-олеоил-ДАГ в динамике К⁺-деполяризации синапсом, содержащих [1-¹⁴C]-олеоил-ФХ; 1—ОК, 2—1,2-ДАГ б. Изменения в содержании 1,2-ДАГ и 2-МГ в [1-¹⁴C]-арахидонатмеченных ЛПКЧ в течение 60 с после инициации ФИ-цикла митогенным лектином КонА; 1—1,2-ДАГ, 2—2-МГ.

Полученные экспериментальные данные по исследованию действия калиевой деполяризации на синапсомы, меченные 1-ацил-2-[1-¹⁴C]олеоил-ФХ в отсутствие радиоактивности во фракциях ФИ также свидетельствуют об активации процесса(ов) деацилирования ФХ с одновременным подавлением выхода [1-¹⁴C]олеоил-ДАГ (рис. 2, а). Примечателен факт несоответствия динамики высвобождения меченой ОК с таковой для АК в идентичных условиях эксперимента, указывающий на наличие в ПМ синапсом метаболически различных (по ЖК составу) пулов фракции ФХ, специфически деацилирующихся при инициации активности ФИ-ФДЭ.

Обнаружение различными исследовательскими группами большого числа клеточных популяций [1, 13, 14], активирующихся через ФИ-цикл, а также выявленные нами закономерности активации ФИ-ФДЭ и процессов деацилирования ФХ в отсутствие лиганд-рецепторного взаимодействия, послужили основанием для проведения серии

исследований по изучению особенностей протекания отмеченных процессов, по своим морфо-функциональным характеристикам отличающихся от синапсом, ЛПЧК под действием митогенного лектина КоА. Установлено, что последний является специфическим агонистом цитотоксической Т-клеточной популяции ЛПЧК.

Под действием митогенной концентрации КоА в $[1-^{14}\text{C}]$ АК-меченных ЛПЧК наблюдалось (рис. 3, б) увеличение содержания ДАГ с максимумами на 5- и 60-й с инициации ФИ-цикла, свидетельствующее об активации ФИ-ФДЭ. Некоторое повышение при этом уровня $[^{14}\text{C}]$ арахидонил-МГ только на 5-й с после действия КоА в отсутствие (рис. 5, а) распада триглицеридов (ТГ) может быть следствием активации ДАГ-липазного пути высвобождения АК.

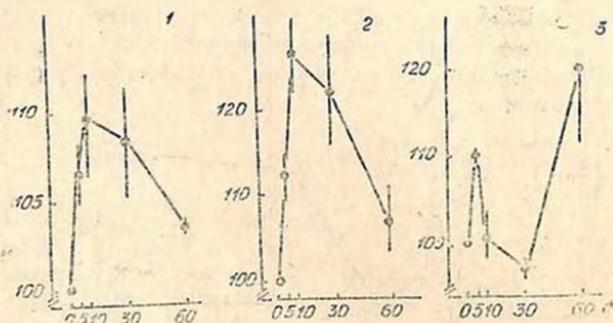


Рис. 4. Динамика КоА-индуцированной активации ФИ-ФДЭ в $[^3\text{H}]$ -инозитмеченных ЛПЧК. 1—инозитмонофосфат, 2—инозитдифосфат, 3—инозиттрифосфат

Наличие в ПМ клеток различных ферментативных механизмов образования и дальнейших метаболических превращений ДАГ делает необходимым проведение дополнительных исследований в вышеотмеченном плане с использованием $[^3\text{H}]$ инозитмеченных клеток для более прямой и корректной оценки активности ФИ—ФДЭ. Повышение уровней $[^3\text{H}]$ инозитмоно- (ИФ₁), дифосфатов (ИФ₂) и ИФ₃ в ЛПЧК с первых секунд инициации ФИ-цикла указывает на активацию диэстеразы, первичным субстратом которой является ФИ-4,5-Ф₂ (рис. 4). Об этом свидетельствует идентичность динамики изменения количества ИФ₃, второго продукта диэстеразного гидролиза отмеченной фракции фосфоинозитидов, с таковой, обнаруженной ранее для $[^{14}\text{C}]$ -ДАГ. Подобная закономерность в корреляции динамик высвобождения ИФ₃ и распада ФИ-4,5-Ф₂ под действием КоА была обнаружена и в $[^3\text{H}]$ -инозитмеченных тимocyтах крыс в идентичных условиях эксперимента (неопубликованные данные).

Согласно немногочисленным литературным данным [15, 16], увеличение количества внутриклеточного Ca^{2+} вследствие инициации ФИ-пути передачи внешних сигналов начинается после 1-ой с акти-

важни клеток и достигаєт максимума через 6—8 с. При этом, если образование ИФ₂ происходит без какого-либо лаг периода, то кальциевый ответ отстает от последнего, по крайней мере, на 1 с [16]. В дальнейшем включаются механизмы входа в клетку внешнего Ca²⁺ через специализированные каналы.

Сопоставление данных проведенных нами исследований с литературными позволяет утверждать о двухфазной динамике активации ФИ-ФДЭ в течение 60 с инициации ФИ-цикла, независимо от типа клеток (синапсомы, ЛПКЧ, тимоциты) и первичного сигнала (K⁺-деполяризация, КоА). Можно заключить, что обнаруженная нами первичная активация ФДЭ на 5-й с инициации ФИ-цикла осуществляется только мембраносвязанным каскадным механизмом, тогда как в последующую, вторичную фазу активации фермента могут быть вовлечены различные внутриклеточные Ca²⁺-зависимые процессы.

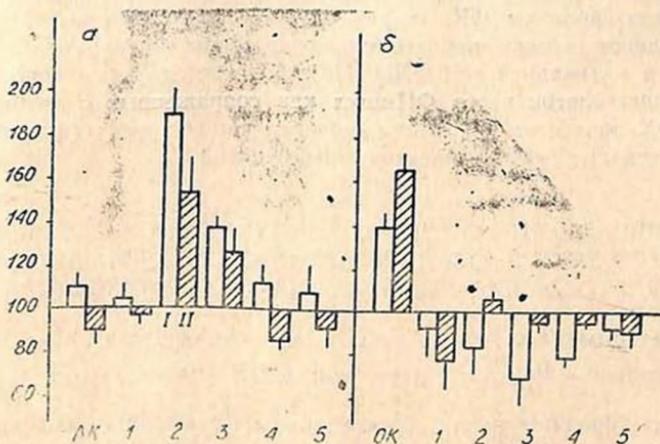


Рис. 5. Сдвиги в содержании НЛ, ЛПКЧ, премеченных (а) [1-¹⁴C]-АК и (б) [1-¹⁴C]-ОК на 5 сек после действия КоА в среде Игла без (I) и с добавлением (II) 5 мМ Са²⁺; 1—МГ, 2—1,2—ДАГ, 3—1,3—ДАГ, 4—триглицериды, 5—эфирь холестерина

Имеются указания [8] относительно активирующего действия ДОХ-На на синапсомную мембраносвязанную ФИ-ФДЭ. Подобное влияние на ее растворимую форму в головном мозгу крыс оказывают [17] ненасыщенные ЖК (АК и ОК), наряду с лизо-ФЛ, обладающими детергентоподобными свойствами. Предполагается также, что клеточная ФИ-ФДЭ ассоциирована со специфическим липидным микроокружением [18], чем и объясняется [19] выраженное ингибирующее действие холинсодержащих ФЛ, в частности ФХ, на ее активность.

Исследование изменений количества отдельных фракций НЛ в ЛПКЧ на 5-й с инициации ФИ-цикла под действием КоА показало

доминирование процессов катаболизма $[1-^{14}\text{C}]\text{-ЛК}$ и $[1-^{14}\text{C}]\text{-ОК}$ -меченных ФЛ по диэстеразному и деацетиловому путям соответственно (рис. 5, а, б). Если добавление в инкубационную среду Игла 5 мМ Ca^{2+} приводило к достоверной активации процесса(ов) деацелирования $[1-^{14}\text{C}]\text{-ОК}$ -модифицированных ФЛ с увеличением выхода свободной ОК, то диэстеразное расщепление $[1-^{14}\text{C}]\text{-ЛК}$ -модифицированных ФЛ претерпевало обратное изменение. Полученные данные свидетельствуют, что начальная, мембраносвязанная фаза активации ФИ-ФДЭ (5 с) и в синантосомах мозга крыс и в ЛПФЧ сопряжена с активацией процессов деацелирования ФХ, преимущественно локализованной во внешнем монослое липидного бислоя клеточных мембран фракции ФЛ.

Таким образом, полученные нами данные позволяют утверждать, что обнаруженная нами быстрая активация Ca^{2+} -зависимых, специфичных по отношению к ЖК составу субстрата реакций деацелирования фракции ФХ, может служить промежуточным регуляторным звеном между процессами воздействия на клетки внешних сигналов и активацией ФИ-ФДЭ. Не исключается также вовлечение в активацию клеток через ФИ-цикл как сопряженных с деацелированием ФХ процессов их рециклирования, так и других фракций ФЛ путем различных метаболических превращений.

MEMBRANE PHOSPHOLIPID DEACYLATION PROCESSES ASSOCIATED WITH PHOSPHOINOSITIDE CYCLE INITIATION IN RAT SYNAPTOSOMES AND HUMAN BLOOD LYMPHOCYTES

TADEVOSIAN Yu. V., ASATRIAN L. Yu., KARAGEUZYAN K. G.

Institute of Molecular Biology, Acad. Sci. of Armenia, Yerevan

Phosphoinositide-specific phosphodiesterase activation and phosphatidylcholine deacylation, associated with phosphoinositide cycle initiation by K^{+} --depolarization and concanavalin A accordingly in rat cerebral cortex synaptosomes and human blood lymphocytes were investigated. Both cells observed similar, biphasic activation of dynamics for phosphoinositide-specific phosphodiesterase during the first minute of the cycle initiation. Phosphatidylcholines fatty acid composition--dependent, specific stimulation of deacylation process(es), correlating with observed phosphodiesterase activation, was shown.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Berridge M. J., Irvine R. F. *Nature*, v. 312, № 5922, p. 315-321, 1984.
2. Nishizuka Y. *Nature*, v. 308, № 5961, p. 693-698, 1984.
3. Gilman A. C. *Cell*, v. 35, p. 577-579, 1984.
4. Hirata F., Axelrod J., Crews F. T. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 76, p. 4813-4816, 1979.

5. Hofmann S. L., Majerus P. W. *J. Biol. Chem.*, v. 257, № 23, p. 14359—14364, 1982.
6. Hajos F. *Brain Res.*, v. 93, № 2, p. 485—489, 1975.
7. Innes J., Runtz M. M., Kim Y. T., Weckster M. E. *J. Clin. Invest.*, v. 64, № 6, p. 1608—1613, 1979.
8. Manning R., Sun G. Y. *J. Neurochem.*, v. 41, № 6, p. 1735—1743, 1983.
9. Corbin D. R., Sun G. Y. *J. Neurochem.*, v. 30, № 1, p. 77—82, 1978.
10. Dole V. P. *J. Clin. Invest.*, v. 35, № 1, p. 150—159, 1955.
11. Bligh E. G., Dyer W. J. *Canad. J. Biochem. Physiol.*, v. 37, № 8, p. 911—917, 1959.
12. Berridge M. J., Dawson R. M. C., Downes C. P., Heslop J. P., Irvine R. F. *Biochem. J.*, v. 212, № 3, p. 473—482, 1983.
13. Hagesawa-Sasaki H. *Biochem. J.*, v. 232, p. 95—100, 1985.
14. King S. L. *Immunology*, v. 65, p. 1—7, 1988.
15. Drummond A. H. *J. Exp. Biol.*, v. 124, p. 337—353, 1986.
16. Berridge M. J. *Biochem. J.*, v. 212, p. 849—856, 1983.
17. Irvine R. F., Letcher A. J., Dawson R. M. C. *Biochem. J.*, v. 178, № 2, p. 497—500, 1979.
18. Lenstra P., Mauco G., Chap H., Doust-Blazy L. *Biochim. et biophys. acta*, v. 792, № 2, p. 199—205, 1984.
19. Irvine R. F., Dawson R. M. C. *Biochem. Sci. Trans.*, v. 8, № 1, p. 27—30, 1980.

Поступила 16. III. 1992