



УДК 576.535.5 : 57.053

ИНГИБИРОВАНИЕ АDP-РИБОЗИЛИРОВАНИЯ
ПОД ДЕЙСТВИЕМ ФАКТОРА РОСТА НЕРВОВ
В КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ ФЕОХРОМОЦИТОМЫ РС-12

*Кондратьев А. Д., Алахов В. Ю., Мовсесян В. А.,
Черный А. А., Каминир Л. Б., Северин Е. С.*

Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва

Исследовано влияние фактора роста нервов (ФРН), выделенного в гомогенном состоянии с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии из семенной плазмы быка, на уровень эндогенного АDP-рибозилирования в клетках феохромоцитомы РС-12. Показано, что ФРН ингибирует АDP-рибозилирование в гомогенате клеток на 30%, при культивировании РС-12 на среде без сыворотки на 25%, при культивировании в присутствии сыворотки — на 50%. Ингибируется АDP-рибозилирование ряда белков, в том числе с молекулярной массой ~40 кДа, вероятно мембранной природы. Обсуждается возможность связи ФРН с аденилатциклазной системой через рецепторзависимое АDP-рибозилирование ее регуляторных компонентов.

Фактор роста нервов (ФРН) — белок, определяющий нормальное развитие и функционирование симпатических и сенсорных нейронов [1]. Эффекты воздействия фактора на клетки-мишени, содержащие на внешней мембране специфические рецепторы ФРН, разделяют на два типа [2]. Эффекты, совпадающие по времени с транспортом ФРН в комплексе с рецептором в ядро, связаны, вероятно, с биосинтезом. Появление ответа на действие фактора уже через несколько минут после его добавления к клеткам, а также отсутствие эффекта ФРН, непосредственно введенного в цитоплазму [3], предполагает наличие рецепторсвязанной системы вторичного мессенджера, опосредующего действие ФРН. Попытки идентифицировать вторичный мессенджер для ФРН показали связь фактора с системами обмена фосфоинозитидов [4, 5], метилирования фосфолипидов [6, 7], кальциевой регуляции [8]. Была также продемонстрирована связь механизма действия ФРН с аденилатциклазной системой, заключающаяся в имитации некоторых эффектов ФРН при повышении внутриклеточного уровня сАМР и вероятном синергизме действия сАМР и фактора на морфологию клеток-мишеней, уровень сАМР-зависимого фосфорилирования и ряд других параметров [9—12]. Удобной моделью для изучения механизма действия фактора служит РС-12 — клональная клеточная линия феохромоцитомы крысы, не требующая в отличие от первичных культур нейронов ФРН для поддержания выживания. Под действием ФРН клетки РС-12 прекращают пролиферировать и приобретают ряд морфологических и биохимических признаков дифференцированного нейрона [13].

Задачей данной работы было исследование изменения уровня эндогенного АDP-рибозилирования — процесса, играющего, вероятно, существенную роль в регуляции аденилатциклазной системы [14], в клетках РС-12 при кратковременном и длительном воздействии ФРН. В экспериментах был использован ФРН, выделенный в гомогенном состоянии из семенной плазмы быка с применением высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Для определения влияния ФРН на уровень эндогенного АDP-рибозилирования клетки РС-12, культивируемые в присутствии сыворотки, инкубировали с фактором 4 сут. Начиная с 3 сут ФРН вызывал рост нейритов у большинства клеток. Под действием ФРН было обнаружено снижение уровня АDP-рибозилирования по сравнению с контрольной величи-

Сокращения: ФРН — фактор роста нервов.

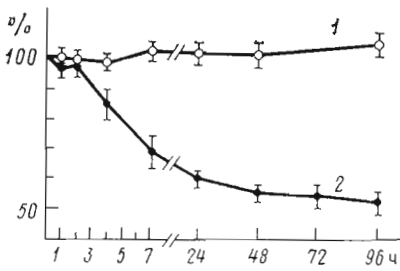


Рис. 1

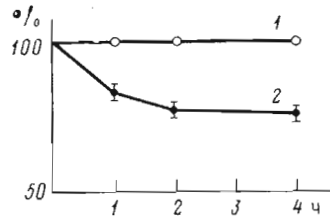


Рис. 2

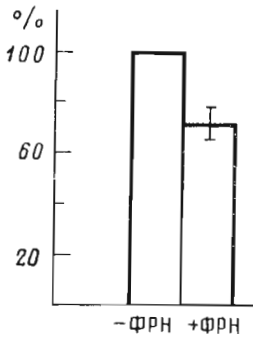


Рис. 3

Рис. 1. Зависимость падения уровня АДР-рибозилирования в клетках РС-12 под действием ФРН от времени: 1 — контрольный уровень; 2 — уровень в присутствии 1,9 нМ ФРН; 100% — контрольный уровень в нулевой момент времени

Рис. 2. Зависимость падения уровня АДР-рибозилирования в клетках РС-12 на бессывороточной среде под действием ФРН от времени: 1 — контрольный уровень; 2 — уровень в присутствии 1,9 нМ ФРН; 100% — контрольный уровень в каждый момент времени

Рис. 3. Падение уровня АДР-рибозилирования в гомогенате клеток РС-12 под действием ФРН

ной. Из графика временной зависимости ФРН-индуцированного ингибирования (рис. 1) видно, что заметный эффект появляется между 2 и 4 ч после добавления фактора и достигает максимальной величины (~50% от контрольного уровня) через 48 ч после стимуляции клеток ФРН.

При добавлении ФРН к клеткам РС-12 на бессывороточной среде значительное ингибирование наблюдается уже через 1 ч и достигает максимального уровня 25% через 2 ч (рис. 2). Ранее было показано, что рост нейритов у клеток РС-12, культивируемых на среде без сыворотки, индуцируется уже на 1-е сут инкубации с фактором [15], что связано, вероятно, с маскирующим действием факторов, стимулирующих клеточную пролиферацию. Действие сыворотки, возможно, замедляет ингибирующее влияние ФРН на АДР-рибозилирование в клетках РС-12.

ФРН снижает уровень АДР-рибозилирования на 30% и при непосредственном добавлении к гомогенату клеток РС-12 (рис. 3). Наличие эффекта в гомогенате клеток и быстрое ингибирование на бессывороточной среде предполагают либо непосредственное влияние на фермент при связывании ФРН с рецептором, либо ингибирование, опосредуемое системой какого-либо вторичного мессенджера, регулируемой комплексом ФРН—рецептор.

На рис. 4 а приведена электрофореграмма АДР-рибозилированных белков гомогената клеток РС-12. Анализ распределения радиоактивности в полиакриламидном геле проводили с помощью автоматизированной системы, как описано в «Экспериментальной части». Использование этой системы позволило быстро (за 30 мин) получить точные данные о количественном распределении изотопа ^{14}C в геле и показать наличие трех основных зон радиоактивности, соответствующих белкам с молекулярной массой ~95, 40 и 12—15 кДа (рис. 5), причем в препаратах, обработанных ФРН, уровень радиоактивности снижается во всех трех зонах. Наличие этих зон подтвердила автордиография, показавшая включение изотопа ^{14}C в белки с M 12, 14, 15, 36, 40, 93 кДа (рис. 4б). Удаление мембранной фракции приводило к исчезновению с автордиограммы полос с M 36 и 40 кДа. Следует отметить, что высокомолекулярная зона включает в себя, по-видимому, неспецифическую полосу, видимую на автордиограмме, образующуюся на границе формирующего и разделяющего гелей.

Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что ФРН вызывает быстрое ингибирование АДР-рибозилирования в клетках РС-12.

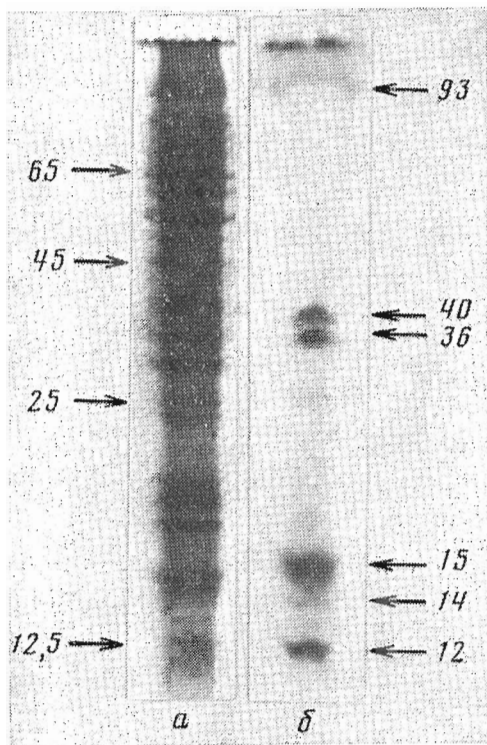


Рис. 4

Рис. 4. *a* — электрофорез в 12,5% полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия ADP-рибозилированных белков гомогената клеток РС-12; *б* — автордиограмма ADP-рибозилированных белков гомогената клеток РС-12. Указаны положения и молекулярные массы (кДа) маркерных белков

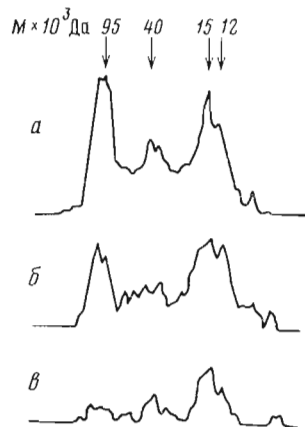


Рис. 5

Рис. 5. Распределение радиоактивности ADP-рибозилированных белков в полиакриламидном геле: *a* — гомогенат клеток РС-12 без ФРН; *б* — гомогенат клеток РС-12 в присутствии ФРН; *в* — то же после 4 сут инкубации с ФРН

Известно, что одним из основных субстратов ADP-рибозилирования в клетке является группа белков, связывающих гуаниновые нуклеотиды [16—20]. К числу таких белков относятся ингибиторный и стимулирующий компоненты аденилатциклазы с молекулярной массой около 40 кДа. Недавно была показана активация аденилатциклазы синаптических мембран из мозга крысы эндогенным моно-ADP-рибозилированием белка с $M \sim 40$ кДа [14]. Наличие аналогичной белковой полосы на автордиограмме (рис. 4б), вероятная мембранная природа субстрата с M 40 кДа; быстрый ингибиторный эффект в гомогенате клеток РС-12 и при культивировании их на среде без сыворотки позволяют предположить возможность связи между аденилатциклазной системой и фактором роста нервов через рецепторзависимое изменение ADP-рибозилирования регуляторных компонентов аденилатциклазы.

Экспериментальная часть

Фактор роста нервов выделяли из семенной плазмы быка по методу Харпера и соавт. [21]. Полученный препарат ФРН примерно 95% чистоты очищали до гомогенного состояния с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии на обращенно-фазном носителе Ultrasyl-Octyl, 10 мкм (колонка $4,6 \times 250$ мм, Altex). Разделение проводили в 0,1% трифторуксусной кислоте при линейном градиенте концентрации ацетонитрила от 0 до 80% и скорости потока 1 мл/мин (общий объем градиента 35 мл). Полученные фракции (рис. 6) упаривали на ротаторном испарителе и тестировали с помощью электрофореза и по биологической активности на нали-

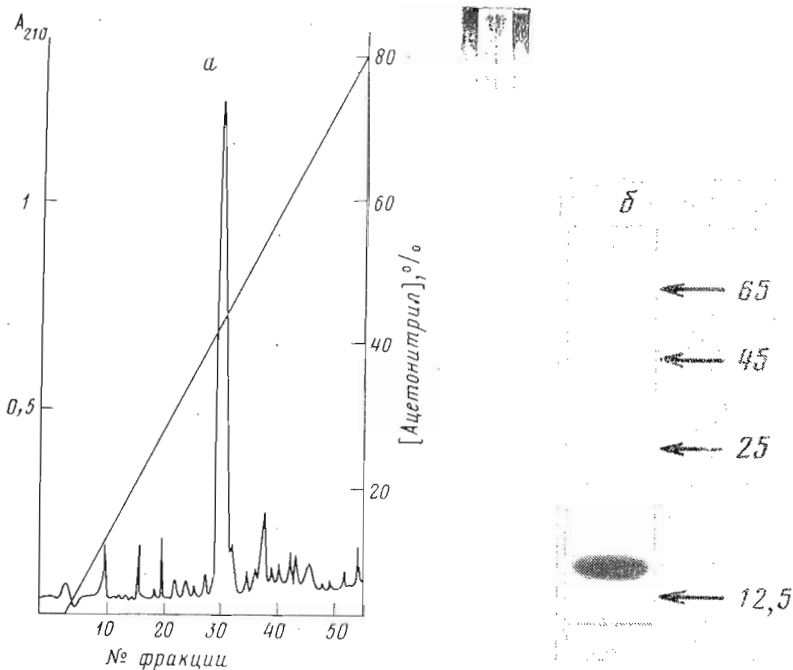


Рис. 6. *a* — профиль элюции препарата ФРН с обращенно-фазного носителя *Ultrasyl-Octyl*, 10 мкм (см. «Экспер. часть»); *b* — электрофорез-грамма гомогенного препарата ФРН, содержащегося во фракциях 29—32. Справа указаны положения и молекулярные массы (кДа) маркерных белков

чие в них ФРН. Гомогенный ФРН, сохранивший полную биологическую активность, содержался во фракциях 29—32 (рис. 6).

Клетки феохромоцитомы PC-12 культивировали на среде RPMI 1640, содержащей 7,5% термоинактивированной лошадиной сыворотки (Flow), 7,5% эмбриональной телячьей сыворотки (Seriva), 50 мкг/мл стрептомицина и 50 ед./мл пенициллина, в пластиковых культуральных флаконах площадью 75 см² (Greiner). При необходимости культуру переводили на ту же среду без сыворотки с предварительной промывкой бессывороточной средой 3 раза по 10 мин. ФРН добавляли в культуральную среду в концентрации 1,9 нМ. Клетки инкубировали при 37° С в увлажненной атмосфере, содержащей 95% воздуха и 5% CO₂.

Для определения эндогенного ADP-рибозилирования клетки PC-12 промывали 3 раза фосфатно-солевым раствором (150 мМ NaCl, 10 мМ NaH₂PO₄, pH 7,2), снимали с пластикового субстрата раствором Версена, осаждали центрифугированием (250 g, 10 мин) и заливали на 5 мин холодным лизирующим буфером, содержащим 10 мМ трис-HCl (pH 7,2), 1 мМ EDTA, 0,1 мМ дитиотреит. Клетки гомогенизировали 1 мин при 800 об/мин в гомогенизаторе тефлон-стекло (В. Врәул) при 4° С.

ADP-рибозилтрансферазную активность определяли как описано ранее [22]. Клеточный гомогенат инкубировали при 37° С в буфере, содержащем 20 мМ трис-HCl (pH 8,0), 4 мМ EDTA, 10 мМ дитиотреит, в течение 30 мин. Реакцию инициировали добавлением [U-¹⁴C]NAD (11 мКи/ммоль) до конечной концентрации 0,5 мМ. Конечный объем реакционной смеси 100 мкл. Реакцию останавливали охлаждением до 0° С. Включение [U-¹⁴C]ADP-рибозы в белок определяли двумя способами:

а) к реакционной смеси добавляли 1 мл холодного ацетона, инкубировали 10 мин при 4° С и центрифугировали (10 000 g, 2 мин). Осадок растворяли в буфере, содержащем 20 мМ трис-HCl (pH 6,8), 6% додецилсульфата натрия, 10% глицерина, 1 мМ дитиотреит и 0,033% бромфенолового синего, и разделяли с помощью электрофореза по методу Лэммли [23]. Гель высушивали и определяли распределение радиоактивности авторадиографией (в течение 30 сут) или с помощью автоматизированной системы

на основе многопроволочного позиционно-чувствительного детектора, сопряженного с мини-ЭВМ СМ-4 [24, 25];

б) реакционную смесь наносили на бумажные фильтры (Whatman 3 MM), которые промывали 20 мин в 10% трихлоруксусной кислоте, а затем 3 раза по 5 мин в 5% трихлоруксусной кислоте. Фильтры высушивали и измеряли радиоактивность на жидкостном сцинтилляционном спектрометре Intertechnique SL-30.

Концентрацию белка определяли по методу [26].

ЛИТЕРАТУРА

1. Yankner B. A., Shooter E. Annu. Rev. Biochem., 1982, v. 51, p. 845—868.
2. Greene L. Trends Neurosci., 1984, v. 7, p. 91—94.
3. Heumann R., Schwab M., Thoenen H. Nature, 1981, v. 292, № 5826, p. 838—840.
4. Traynor A., Schubert D., Allen W. J. Neurochem., 1982, v. 39, p. 1677—1683.
5. Lakshmanan J. J. Neurochem., 1979, v. 32, p. 1599—1601.
6. Pfenninger K., Johnson M. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1981, v. 78, № 12, p. 7797—7800.
7. Seeley P., Rukenstein A., Connolly J., Greene L. J. Cell. Biol., 1984, v. 98, № 2, p. 417—426.
8. Schubert D., LaCorbiere M., Whitlock C., Stallcup W. Nature, 1978, v. 273, № 5665, p. 718—723.
9. Kondratyev A., Movsesyan V., Severin E. J. Neurochem., 1985, v. 44, suppl., S139C.
10. Heidemann S., Joshi H., Schechter A., Fletcher J., Bothwell M. J. Cell. Biol., 1985, v. 100, № 3, p. 916—928.
11. Halegoua S., Patrick J. Cell, 1980, v. 22, p. 571—581.
12. Guroff G., Dickens G., End D., Londos C. J. Neurochem., 1981, v. 37, p. 1431—1439.
13. Greene L., Tishler A. Adv. Cell. Neurobiol., 1982, v. 3, p. 373—414.
14. Фоменко А. И., Халмуратов А. Г., Степаненко С. П., Пожарун С. В. Материалы V Всесоюзного симпозиума «Циклические нуклеотиды и системы регуляции ферментативных реакций». Рязань, 1985, с. 120.
15. Кондратьев А. Д., Мовсесян В. А., Курочкин С. Н., Дудкин С. М., Северин Е. С. Биотехнология, 1985, № 2, с. 91—97.
16. Gill D., Mereu R. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1978, v. 75, p. 3050—3054.
17. Cassel D., Pfeuffer T. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1978, v. 75, p. 2669—2673.
18. Murayama T., Ui M. J. Biol. Chem., 1983, v. 258, № 5, p. 3319—3326.
19. Hildebrandt J., Sekura R., Codina J., Jyengar R., Manklark C., Birnbaumer L. Nature, 1983, v. 302, № 5910, p. 706—709.
20. Cockroft S., Gomperts B. Nature, 1985, v. 314, p. 534—536.
21. Harper G., Glanville R., Thoenen H. J. Biol. Chem., 1982, v. 257, № 14, p. 8541—8548.
22. Adamietz P., Klapproth R., Hiltz H. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1979, v. 91, № 4, p. 1232—1238.
23. Laemmli U. K. Nature, 1970, v. 227, № 5259, p. 680—685.
24. Абдушукров Д. А., Абдурашидова Г. Г., Запеский Ю. В., Иванов А. Б., Каминир Л. Б., Крейндин Э. Я., Мовчан С. А., Пешехонов В. Д., Чан Дык Тхань, Черненко С. П., Черный А. А. Препринт ОИЯИ, 1984, 18-84-182, Дубна, с. 1—10.
25. Абдурашидова Г. Г., Абдушукров Д. А., Аксентьева М. С., Будовский Э. И., Запеский Ю. В., Каминир Л. Б., Пешехонов В. Д., Черный А. А. Препринт ОИЯИ, 1985, 18-85-129, Дубна, с. 1—5.
26. Bradford M. Anal. Biochem., 1976, v. 72, № 1, p. 248—254.

Поступила в редакцию
4.XII.1985

NERVE GROWTH FACTOR INHIBITS ADP-RIBOSYLATION IN PHEOCROMOCYTOMA PC-12 CELL LINE

KONDRATYEV A. D., ALAKHOV V. Yu., MOVSESYAN V. A.,
CHERNYI A. A., KAMINIR L. B., SEVERIN E. S.

*Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences
of the USSR, Moscow*

The effect of nerve growth factor (NGF), purified to homogeneity from bovine seminal plasma using HPLC, on the level of endogenous ADP-ribosylation in pheochromocytoma PC-12 cell line was studied. NGF caused a 30% inhibition of ADP-ribosylation in the cellular homogenate, a 25% inhibition during serum-free cultivation, and a 50% inhibition in the presence of serum in the culture medium. NGF inhibited ADP-ribosylation of several proteins, including a protein with molecular weight of 40 000, probably of membrane origin. A possibility of the interrelation between NGF and cyclase system via receptor-dependent ADP-ribosylation of regulatory components of the adenylate cyclase was discussed.