

АНАЛІЗ СИГНАЛЬНИХ ШЛЯХІВ, АКТИВОВАНИХ НІКОТИНОВИМИ АЦЕТИЛХОЛІНОВИМИ РЕЦЕПТОРАМИ У КЛІТИНАХ В-ЛІМФОЦИТАРНОГО ПОХОДЖЕННЯ

Д. М. ОМЕЛЬЧЕНКО, О. М. КАЛАШНИК, Л. М. КОВАЛЬ,
М. В. СКОК, С. В. КОМІСАРЕНКО

*Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;
e-mail: skok@biochem.kiev.ua*

Досліджено експресію нікотинових ацетилхолінових рецепторів (НАХР) у клітинах пре-В лімфоми курчат лінії DT40. Показано, що клітини DT40 експресують принаймні $\alpha 7$ -вмісні НАХР, кількість їх підвищується після інкубації з 10 мкМ нікотином. Додавання 10 мкМ холіну сприяє включенню у клітини 3-[4,5диметилтриазол-2-іл]-2,5-дифенілтетразолію броміду (МТТ); ефект холіну дозозалежно знімається 2,5–25 нМ метиллікаконітином (МЛА) та 10–100 нМ α -кобратоксином, що свідчить про участь $\alpha 7$ -вмісних НАХР у підтриманні проліферативного потенціалу клітин DT40. Як нікотин, так і холін, посилюють дію 0,5 мкМ іономіцину, який знижує життєздатність клітин за рахунок входу іонів Са. Навпаки, пригнічувальний ефект 1 мкМ пероксиду водню, який впливає переважно на мітохондрії клітин, зменшується у присутності холіну, але посилюється 2,5 нМ МЛА. Показано, що активність кіназ MEK1/2 та PKC є необхідною для підтримання проліферативного потенціалу клітин DT40. МЛА посилює ефект інгібітора протеїнкіназ MEK1/2 (U0126), однак пригнічувальний вплив самого МЛА при цьому зменшується. Присутність інгібітора СаМКП кінази (KN-62) також знижує ефект МЛА, а у присутності інгібітора PKC (хелеритрину) МЛА сприяє виживанню клітин. Ці дані свідчать про залучення кіназ MEK1/2 і СаМКП до сигналювання, залежного від $\alpha 7$ -вмісних НАХР в клітинах DT40 та про ключову роль PKC у цьому процесі.

Ключові слова: нікотиновий ацетилхоліновий рецептор, проліферація, клітини лінії DT40, холін, MEK1/2, PKC.

Нікотинові ацетилхолінові рецептори є пентамерними лігандзалежними іонними каналами, до складу яких входять різні комбінації α - і β -субодиниць. Залежно від субодиничного складу, вони виявляють різну іонну селективність: м'язові НАХР проникні переважно для іонів Na^+ , а НАХР нейрональних субтипів, особливо гомопентамери альфа7 субодиниць, – для іонів Ca^{2+} , який є месенджером багатьох внутрішньоклітинних сигнальних подій [1]. У вищих тварин НАХР було знайдено в центральній та периферичній нервовій системі, а також у нейро-м'язових з'єднаннях, де вони опосередковують швидку синаптичну передачу та регулюють вивільнення нейромедіаторів [2]. Окрім збудливих клітин, нікотинові рецептори також експресуються у клітинах шкіри, ендотелії судин, епітелії дихальних шляхів та шлунково-кишкового тракту, на макрофагах і лімфоцитах, де вони регулюють різноманітні клітинні функції, включаючи ріст, продукцію цитокінів, проліферацію та диференціювання [3].

У наших попередніх роботах НАХР було ідентифіковано у клітинах гібридоми та нормальних В-лімфоцитах мишей і встановлено їхню роль у регуляції проліферації цих клітин [4]. В експериментах з нокаутними мишами, в яких були відсутні деякі із субодиниць нікотинових рецепторів, було показано, що НАХР беруть участь у регуляції активації В-лімфоцитів та продукції ними антитіл [5]. Однак наскільки ці ефекти характерні для клітин інших видів тварин та сигнальні механізми, які опосередковують ефекти НАХР в В-лімфоцитах, залишається невідомим.

Клітинна лінія DT40 походить від бурсальної лімфоми курчати, що була спричинена вірусом лейкозу птахів. Вона відповідає стадії диференціювання пре-В-лімфоцитів і широко застосовується для вивчення сигнальних шляхів, які активуються В-клітинним рецептором та іонами Са [10]. Метою нашої роботи було встановити роль, яку відіграють НАХР у підтриманні виживання та проліферативного потенціалу клітин DT40, та ідентифікувати

ензими, які опосередковують передачу сигналу від nAHP всередину клітини.

Матеріали і методи

У роботі було використано клітини лінії DT40, люб'язно надані д.б.н. С. П. Сидоренко (Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України). Альфа-кобратоксин було отримано і кон'юговано з ізотіоціанатом флуоресцеїну в Інституті біоорганічної хімії ім. академіків М. М. Шемякіна і Ю. А. Овчинникова РАН, як описано [6–7] і люб'язно надано нам доктором Ю. М. Уткіним. Антитіла проти фрагментів різних субодиниць nAHP: $\alpha 4$ (181–192), $\alpha 7$ (179–190), $\alpha 2$ (190–200) та $\alpha 4$ (190–200), було отримано та біотинільовано нами раніше [8–9]. Холін, метилліаконітин (МЛА), нікотин, інгібітори кіназ, бромід 3-[4,5диметилтриазол-2-іл]-2,5-дифенілтетразолію (МТТ), реагенти для культивування клітин та імуноферментного аналізу і антитіла М4 проти імуноглобулінів G курчати було придбано у фірми Sigma, США.

Клітини вирощували в культуральному середовищі RPMI 1640 з додаванням 20 мМ NEPERES, 40 мкг/мл гентаміцину, 10% ембріональної сироватки теляти і 1% курячої сироватки. Життєздатність клітин оцінювали за включенням трипанового синього.

Для вивчення поверхневої експресії nAHP було використано метод клітинного імуноензиматичного аналізу (ІЕА) та протокової цитофлуориметрії.

Суспензію клітин (1×10^6 клітин/мл) у фізіологічному розчині, забуференому фосфатом (ЗФР), рН 7,2–7,4, з 0,5% бичачого сироваткового альбуміну (БСА), вносили в лунки 96-лункових полістирольних планшетів для ІЕА (Nunc Maxisorp, Данія), і фіксували висушуванням при 37 °С протягом 18 год. Після цього планшети блокували 1%-им розчином БСА (1 год 37 °С) і додавали афінноочищені антитіла кроля проти різних субодиниць nAHP (10–20 мкг/мл в ЗФР з 0,05% твіну 20 (ЗФР-твін), 2 год., 37 °С). Після відмивань водою у планшети додавали антитіла кози до імуноглобулінів G кроля, кон'югованими з пероксидазою. Активність пероксидази виявляли розчином хромогенного субстрату: 0,4 мг/мл о-фенілєндіаміну з 0,01% пероксиду водню в 0,05 М фосфатному буфері з рН 6,0. Реакцію зупиняли додаванням 2 М розчину сірчаної кислоти та фотометрували при довжині хвилі 492 нм на фотометрі StatFax 2100 (Awareness Technology, США).

В експериментах з протокової цитофлуориметрії клітини у пробірці для аналізу вносили 1×10^6 клітин на пробу в ЗФР з 1% БСА, інкубували протягом 15 хв при 4 °С з α -кобратоксином, міченим ізотіоціанатом флуоресцеїну (КТ-ФІТЦ, 2,5 мкг/мл), після чого пробу розводили в 10 разів ЗФР з 1% БСА. Клітини аналізували на проточному цитофлуориметрі EPICS XL (Beckman Coulter, Франція) з відповідним програмним забезпеченням.

Для вивчення впливу агоністів і антагоністів $\alpha 7$ -вмісних nAHP, а також інгібіторів сигнальних кіназ на життєздатність і проліферацію клітин DT40 останні розсівали в 96-лункові планшети в кількості $1,5 \times 10^4$ клітин на лунку і культивували у присутності нікотину, холіну чи МЛА і/або іономіцину, пероксиду водню, антитіл проти IgM курчати або інгібіторів протеїнкінази С (хелеритрин), Са-кальмодулінзалежної кінази (KN-62), фосфатидилінозитол-3-кінази (вортманін) або кіназ MEK 1/2 (U0126) протягом 2 діб. Кількість і життєздатність клітин у пробах визначали за включенням МТТ або протоковою цитофлуориметрією за включенням йодиду пропідію та зв'язуванням анексіну V. МТТ вносили до культурального середовища у концентрації 0,4 мг/мл. Після 4 год інкубації при 37 °С утворені кристали формазану розчиняли у 100 мкл диметилсульфоксиду, до лунок додавали 25 мкл гліцинового буфера (0,1 М гліцин, 0,1 М NaCl, рН 10,5) і фотометрували планшети на фотометрі StatFax 2100 при довжині хвилі 545 нм [9]. Для визначення апоптозних клітин проби інкубували з ФІТЦ-міченим анексіном V (1 мкг/мл) в анексіновому буфері (10 мМ NEPERES рН 7,4, 140 мМ NaCl, 2,5 мМ CaCl₂) протягом 15 хв, після чого відмивали ЗФР з 1% БСА і аналізували на цитофлуориметрі EPICS XL. Йодид пропідію додавали до суспензії клітин в концентрації 10 мкг/мл безпосередньо перед аналізом.

Обчислення середніх значень та стандартного відхилення, статистичний аналіз достовірності відмінності величин всіх описаних експериментів за стандартним критерієм *t*-тесту Стьюдента та побудову графіків виконували за допомогою пакету програм OriginPro 7.5. Результати експериментів виражали як середні значення \pm стандартна помилка. Значення у разі $P < 0,05$ розглядалися як достовірні.

Результати та обговорення

За даними протокової цитофлуориметрії та клітинного ІФА, досліджені клітини зв'язували антитіла проти $\alpha 4$ -, $\alpha 7$ -, $\beta 4$ - і $\beta 2$ -субодиниць

наХР та ФІТЦ-мічений α -кобратоксин (рис. 1, А–Б). Зв'язування як антитіл (рис. 1, А), так і КТ-ФІТЦ (рис. 1, Б) збільшувалося на клітинах, які інкубували у присутності 10 мкМ нікотину. Зв'язування α -кобратоксину не є видоспецифічним, що дозволяє використовувати його для ідентифікації наХР на клітинах різного видового походження. Антитіла, використані нами в експериментах, було одержано проти фрагментів субодиниць наХР щура, які не є ідентичними відповідним субодиницям наХР курчати. Однак збільшення кількості зв'язаних антитіл на клітинах DT40 після інкубації з нікотинном свідчило на користь того, що антитіла дійсно впізнавали відповідні наХР. У літературі добре описаний феномен так званої «ур-регуляції», коли хронічна дія нікотину збільшує кількість сайтів зв'язування радіоактивних лігандів нікотинних рецепторів на клітинах у культурі, в мозку гризунів та людей [11]. Раніше ми спостерігали підвищене зв'язування антитіл проти субодиниць наХР на клітинах гібридами, що культивувались у присутності нікотину [4]. Одержані дані свідчать про те, що клітини DT40 експресують декілька субтипів наХР і принаймні один з них містить $\alpha 7$ -субодиниці.

Клітини DT40 виявились чутливими до дії лігандів $\alpha 7$ -вмісних наХР: холіну, МЛА та α -кобратоксину. Саме цей субтип наХР є переважно проникним для Ca^{2+} і, як описано у низці робіт, впливає на проліферативні процеси в незбудливих клітинах [4, 12–13]. Як показано на рис. 2, 10 мкМ холін сприяє

включенню МТТ у клітини DT40, а його ефект дозозалежно знімається МЛА. У концентрації 2,5 нМ МЛА є специфічним блокатормом гомомерних $\alpha 7$ -вмісних наХР; збільшення концентрації МЛА до 25 нМ блокує також гетеромерні наХР, що містять $\alpha 7$ -субодиницю [14]. Пригнічення ефекту холіну також спостерігалося у присутності 10–100 нМ α -кобратоксину (рис. 3). Як МЛА, так і α -кобратоксин, самі по собі пригнічували включення МТТ. Таким чином, активність $\alpha 7$ -вмісних наХР є необхідною для підтримки проліферативного потенціалу клітин DT40. Слід зазначити, що позитивний ефект холіну спостерігається лише в клітинах, які культивували в неоптимальних умовах (без додавання 1% курячої сироватки), в той час як МЛА та α -кобратоксин пригнічували проліферацію і у присутності сироватки курчати. Ці дані дозволяють припустити, що за наявності ростових факторів курячої сироватки клітини DT40 продукують ендogenousний ліганд $\alpha 7$ -вмісних наХР, тому додавання холіну вже не впливає на інтенсивність включення МТТ.

МТТ-тест характеризує інтенсивність мітохондріального дихання клітин, і кінцевий сигнал оптичного поглинання є пропорційним кількості клітин у пробі за умов стабільності цього параметра. Ми контролювали кількість живих і мертвих клітин у пробах за включенням трипанового синього, а також розмір кристалів формазану, утворених окремими клітинами, під мікроскопом. Однак беззаперечно інтерпретувати одержані дані як

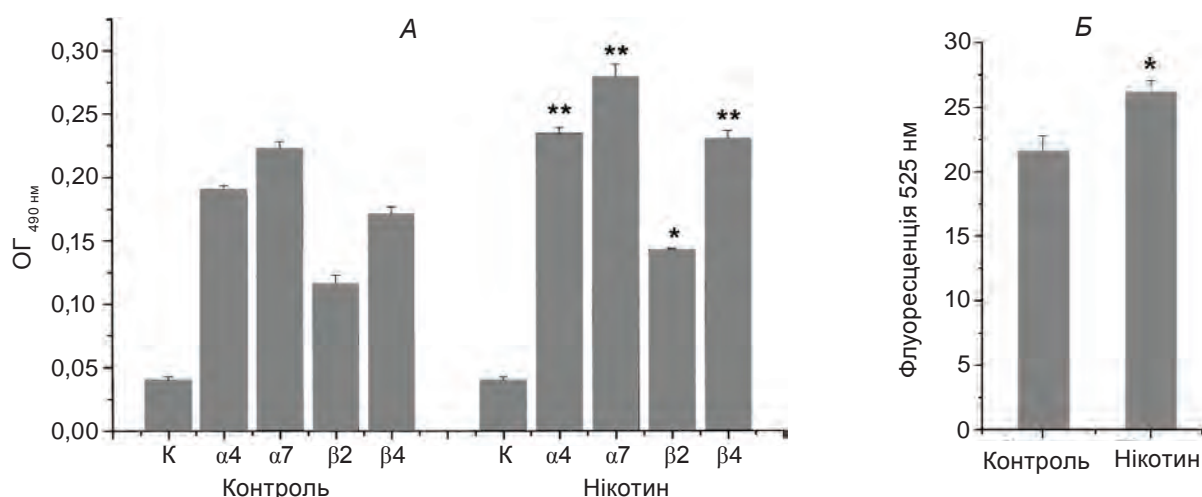


Рис. 1. Вплив 10 мкМ нікотину на зв'язування клітинами DT40 наХР-специфічних антитіл (клітинний IEA (А)) або ФІТЦ-міченого α -кобратоксину (протокова цитофлуориметрія (Б)). Інкубація протягом 3 діб; К – неспецифічні імуноглобуліни кроля. ($M \pm m$; $n = 3$, * $P < 0,05$; ** $P < 0,005$ порівняно з контрольними клітинами)

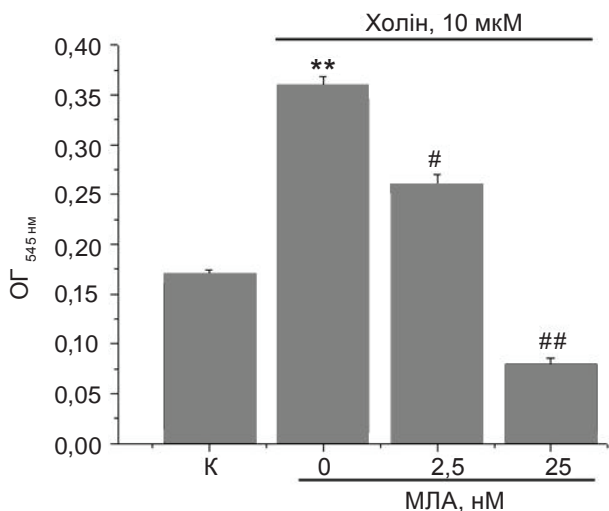


Рис. 2. Вплив холіну та МЛА на утворення кристалів формазану в МТТ-тесті клітинами DT40. Інкубація протягом 3 діб; К – контрольні клітини. ($M \pm t$; $n = 3$, ** $P < 0,005$ порівняно з клітинами, які інкубували без холіну; # $P < 0,05$; ## $P < 0,005$ порівняно з клітинами, які інкубували тільки з холіном)

результат проліферації клітин не є коректним. Вони характеризують інтегральний стан життєздатності та інтенсивності ділення культури і свідчать про те, що $\alpha 7$ -вмісні nAHP, експре-

совані в клітинах DT40, сприяють виживанню та проліферації їх.

Для з'ясування механізму впливу nAHP на ці процеси вивчалися сумісна дія на клітини DT40 агоністів nAHP (холіну і нікотину) і реагентів, що пригнічують життєдіяльність клітин за різними механізмами: іономіцину, пероксиду водню та антитіл проти антиген-специфічного рецептора.

Іономіцин – це іонофор, який сприяє входу до клітини Ca^{2+} , що призводить до порушень клітинного циклу («арешту» в G1 фазі) або апоптозу [15]. Як показано на рис. 4, 0,5 мкМ іономіцин суттєво знижує життєздатність клітин DT40, а додавання як нікотину, так і холіну посилює його ефект. Цей факт було підтверджено даними цитофлуориметрії, де інкубація з 0,5 мкМ іономіцином протягом 24 год збільшує майже вдвічі кількість клітин, що включають йодид пропідію, а додавання нікотину підвищує цей показник з 57 до 75%. Навпаки, якщо пригнічувальний ефект спричинювали додаванням 1 мкМ пероксиду водню, то холін підвищував життєздатність клітин DT40, а МЛА посилював дію H_2O_2 (рис. 4). Цей ефект спостерігається і через п'ять годин інкубації, коли клітини ще не встигають поділитися. На відміну від іономіцину, пероксид водню діє переважно на мітохондріальну ланку активації апоптотичних подій [16]. Одержані

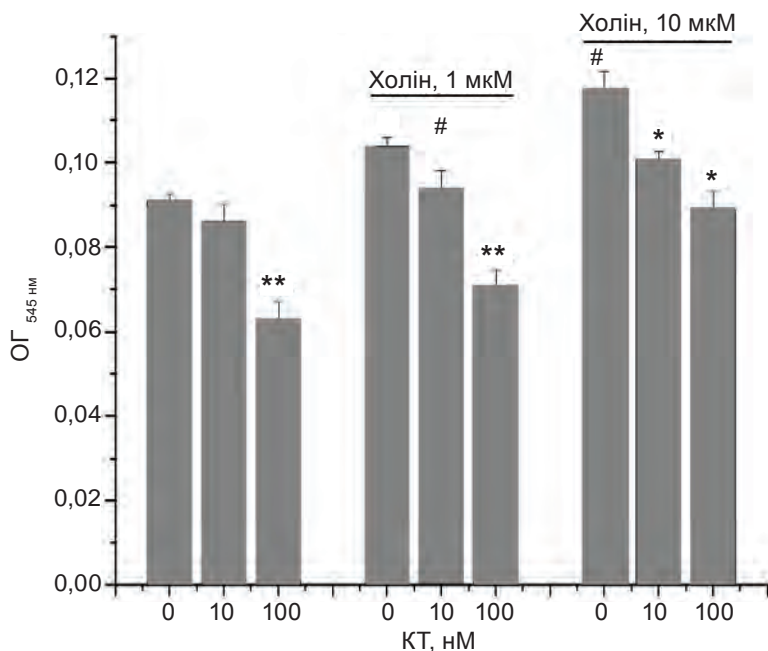


Рис. 3. Вплив холіну та α -кобратоксину (КТ) на утворення кристалів формазану в МТТ-тесті клітинами DT40. Інкубація протягом 3 діб. ($M \pm t$; $n = 3$, * $P < 0,05$; ** $P < 0,005$ порівняно з клітинами, які інкубували без α -кобратоксину; # $P < 0,05$ порівняно з клітинами, які інкубували без холіну)

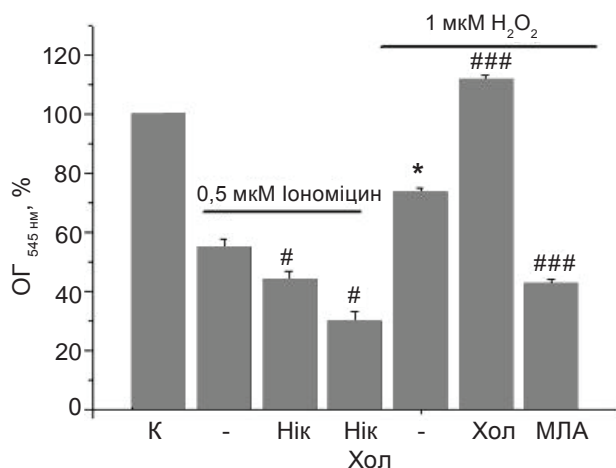


Рис. 4. Вплив 10 мкМ нікотину (Нік), 100 нМ холіну (Хол) та 2,5 нМ МЛА на утворення кристалів формазану в МТТ-тесті клітинами DT40 у присутності іономіцину або пероксиду водню. Інкубація протягом 24 год; К – контрольні клітини. ($M \pm m$; $n = 3$, * $P < 0,05$; ** $P < 0,005$ порівняно з контрольними клітинами; # $P < 0,05$; *** $P < 0,0005$ порівняно з клітинами, інкубованими у присутності тільки іономіцину або H_2O_2). Дані нормалізовано відносно контрольних клітин

нами дані свідчать на користь того, що активація нАХР у клітинах DT40 супроводжується входом до них Ca^{2+} (що підсилює ефект іономіцину) і, вірогідно, захищає мітохондрії від дії пероксиду водню. З літератури відомо, що нікотин підтримує відновлювально-окислювальний стан мітохондрій, запобігає появі вільного цитохрому *c* та знижує продукцію супероксидних радикалів завдяки зв'язуванню з комплексом I дихального ланцюга мітохондрій [17]. Наші дані свідчать про те, що протективний ефект нікотину на діяльність мітохондрій може також бути опосередкований нАХР.

Одним із специфічних шляхів індукції апоптозу в пре-В-лімфоцитах є зшивання їх антигенспецифічного рецептора бівалентними антитілами. В наших експериментах після інкубації клітин DT40 з антитілами проти IgM курчати (10 мкг/мл) протягом 16 год у протоковій цитофлуориметрії було виявлено 44% клітин, що зв'язували ФІТЦ-мічений анексин V. Жоден з нАХР-специфічних лігандів (нікотин, холін, МЛА) не змінює цієї кількості апоптотичних клітин і не впливає на інтенсивність забарвлення в МТТ-тесті за дії антитіл. Це свідчить про те, що сигнальні шляхи, які

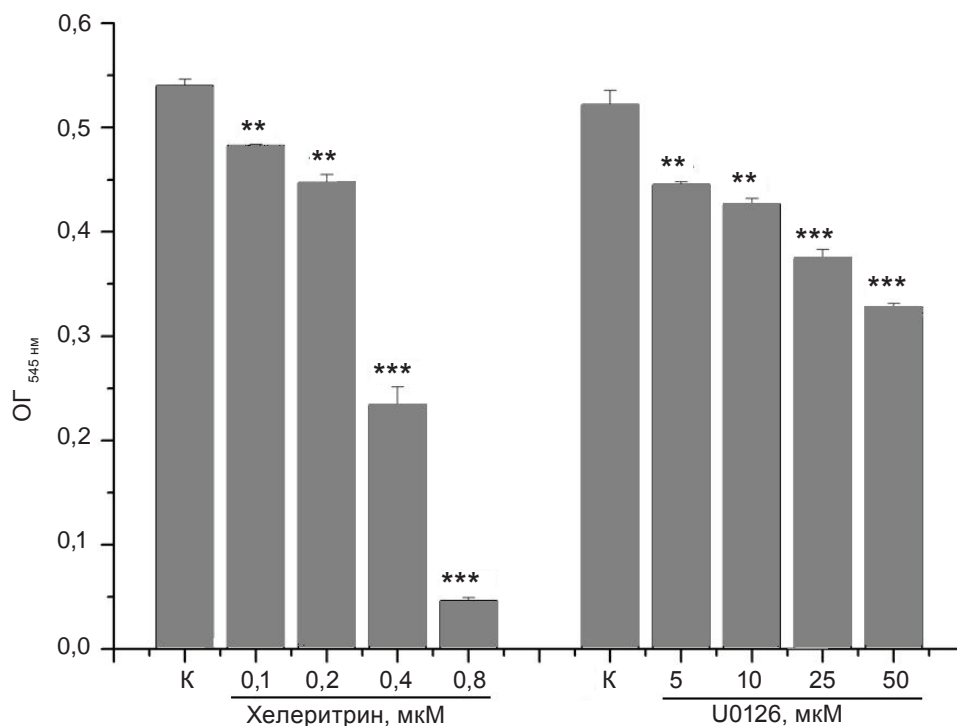


Рис. 5. Вплив інгібіторів протеїнкінази C (хелеритрину) та MAP-кіназа MEK 1/2 (U0126) на утворення кристалів формазану в МТТ тесті клітинами DT40. Інкубація протягом 24 год; К – контрольні клітини. ($M \pm m$; $n = 3$, * $P < 0,05$; ** $P < 0,005$; *** $P < 0,0005$ порівняно з контрольними клітинами)

активуються nAHP у клітинах DT40, не впливають на шлях індукції апоптозу антитілами проти антигенспецифічного рецептора.

Для ідентифікації внутрішньоклітинних білків, які опосередковують вплив nAHP на клітини DT40, було використано специфічні інгібітори кількох ензимів сигнальних каскадів. У разі культивування протягом 24 год U0126 і хелеритрин, але не KN-62 та вортманін, дозозалежно інгібують утворення кристалів формазану в МТТ-тесті (рис. 5). Ці дані свідчать про те, що для підтримання проліферативного потенціалу клітин DT40 необхідною є активність кіназ MEK1/2 та РКС, тоді як PI3-кіназа та Ca-кальмодулінзалежна кіназа (CaMKII) не є критичними. Додавання МЛА у присутності U0126 посилює ефект цього інгібітора (рис. 6, А), однак пригнічувальний вплив МЛА при цьому зменшувався вдвічі (з 27 до 12% максимально). Присутність KN-62 також знижує ефект МЛА (з 16 до 10,5% максимально). На фоні хелеритрину МЛА взагалі підвищує життєздатність клітин (рис. 6, Б). Ці дані свідчать про залучення кіназ MEK1/2 і CaMKII до сигналювання, залежного від $\alpha 7$ -вмісних nAHP у клітинах DT40 та про ключову роль РКС в цьому процесі. Такий висновок добре узгоджується з даними про синергізм агоністів nAHP та іономіцину, дію якого в Т-лімфоцитах теж пов'язують із входом Ca^{2+} та активацією протеїнкінази С (рис. 4 та [19]), а також про нечутливість до дії лігандів nAHP шляху апоптозу, індукованого зшивкою антигенспецифічного рецептора, який активує PI3-кіназний сигнальний шлях [18].

У нейронах, де діяльність nAHP вивчено найдетальніше, активація цих рецепторів, з одного боку, призводить до виникнення іонних струмів, що є головним чинником передачі сигналу збудження. З іншого боку, підвищення внутрішньоклітинної концентрації іонів Ca^{2+} , що є особливо характерним для $\alpha 7$ -вмісних nAHP, веде до активації MAP-кіназ ERK1/2, та «up-регуляції» Vcl-2 і пригнічення експресії каспази-3 (через PI3-кіназу і протеїнкіназу В) [20], внаслідок чого впливає на клітинну проліферацію або виживання. Крім того, відкриття іонного каналу супроводжується конформаційними змінами, які можуть активувати кінази, зв'язані з мембраною. Після активації молекула nAHP підлягає фосфорилуванню за залишками серину/треоніну та тирозину. Відповідно було знайдено, що у нейронах nAHP, зв'язані з протеїнкіназами А, С, тирозиновими кіназами родини Src і кіназою JAK2 [21–22]. В кератиноцитах шкіри $\alpha 7$ -вмісні nAHP виявилися з'єднаними з CaMKII, РКС і PI3-кіназами [23]. В Т-лімфоцитах інкубація з нікотинном призводила до підвищення концентрації внутрішньоклітинного Ca^{2+} , активації тирозинових кіназ і фосфоліпази С1 [24–25]. У В-лімфоцитах також було показано підвищення внутрішньоклітинної концентрації Ca^{2+} у разі активації nAHP [26], однак подальші шляхи сигналювання, залежного від nAHP, в цих клітинах невідомі. Одержані нами дані свідчать про те, що $\alpha 7$ -вмісні nAHP, експоновані на клітинній лінії В-лімфоцитарного походження DT40, активують сигнальні каскади, які підтримують проліферативний потенціал

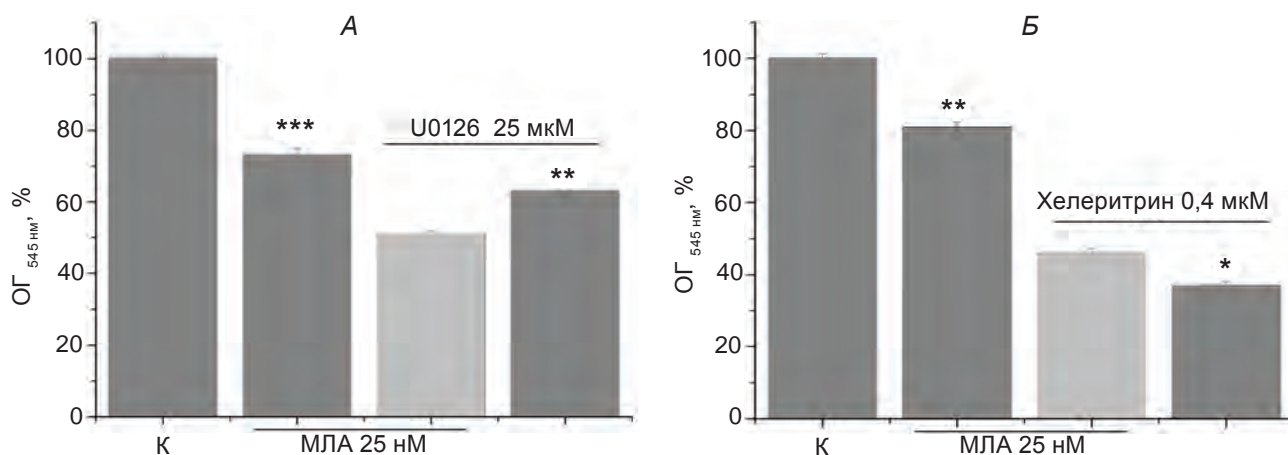


Рис. 6. Сумісний вплив МЛА та U0126 (А), і МЛА та хелеритрину (Б) на утворення кристалів формазану в МТТ-тесті клітинами DT40. Інкубація протягом 24 год; К – контрольні клітини. (M ± m; n = 3, * P < 0,05; ** P < 0,005; *** P < 0,0005 порівняно з клітинами, інкубованими із сумішшю МЛА та відповідного інгібітора (сірий стовпчик)). Дані нормалізовано відносно контрольних клітин

і виживання цих клітин. Ключовим пунктом їхньої взаємодії є протеїнкіназа С; спільними сигнальними елементами є також MAP-кінази MEK 1/2 та CaMKII кіназа.

Роботу було підтримано грантом компанії Philip Morris USA через Фонд цивільних досліджень та розвитку США.

АНАЛИЗ СИГНАЛЬНЫХ ПУТЕЙ, АКТИВИРУЕМЫХ НИКОТИНОВЫМИ АЦЕТИЛХОЛИНОВЫМИ РЕЦЕПТОРАМИ В КЛЕТКАХ В-ЛИМФОЦИТАРНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Д. Н. Омельченко, Е. Н. Калашник,
Л. Н. Коваль, М. В. Скок,
С. В. Комисаренко

Інститут біохімії ім. А. В. Палладина
НАН України, Київ;
e-mail: skok@biochem.kiev.ua

Исследована експресія нікотинових ацетилхолинових рецепторів (nAChR) на клітках пре-В-лимфоми кур лінії DT40. Показано, що клітки лінії DT40 експресують, по крайній мері, $\alpha 7$ -содержащіє nAChR, їх кількість підвищується інкубуванням з 10 мкМ нікотином. Додавання 10 мкМ холина сприяє включенню 3-[4,5-диметилтриазол-2-ил]-2,5-дифенілтетразолію броміда (МТТ); ефект холина дозозависимо знімається 2,5–25 нМ метилликаконітином (МЛА) і 10–100 нМ α -кобратоксінном, що свідчить про участь $\alpha 7$ -содержащих nAChR в підтриманні проліферативного потенціала кліток DT40. Як нікотин, так і холин посилюють дію 0,5 мкМ іономицину, який знижує життєспроможність кліток за рахунок входу іонів Са. Навпаки, подавляючий ефект 1 мкМ пероксида водороду, який впливає переважно на мітохондрії кліток, зменшується в присутності холина, але посилюється МЛА (2,5 нМ). Показано, що активність киназ MEK1/2 і PKC є необхідною для підтримання проліферативного потенціала кліток DT40. МЛА посилює ефект інгібітора протеїнкінази MEK1/2 (U0126), але подавляючий ефект самого МЛА при цьому зменшується. Присутність інгібітора CaMKII кинази (KN-62) також знижує ефект МЛА, а в присутності інгібітора PKC (хелеритрина) МЛА сприяє виживанню кліток. Ці дані свідчать про участь киназ MEK1/2 і CaMKII в сигналізмі

$\alpha 7$ -содержащих nAChR в клітках DT40, а також про ключову роль PKC в цьому процесі.

Ключевые слова: нікотиновий ацетилхолиновий рецептор, проліферація, клітки лінії DT40, холин, MEK1/2, PKC.

ANALYSIS OF SIGNALING PATHWAYS ACTIVATED BY NICOTINIC ACETYLCHOLINE RECEPTORS IN B-LYMPHOCYTE-DERIVED CELLS

D. M. Omelchenko, O. M. Kalashnik,
L. M. Koval, M. V. Skok, S. V. Komisarenko

Palladin Institute of Biochemistry, National
Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: skok@biochem.kiev.ua

Summary

The expression of nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) in the chicken pre-B-lymphoma DT40 cell line was investigated. DT40 cells were shown to express at least $\alpha 7$ -containing nAChRs; their amount increased upon incubation with 10 μ M nicotine. Addition of 10 μ M choline favoured the inclusion of 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT); the effect of choline was inhibited by 2.5–25 nM methyllicaconitine (MLA) or 10–100 nM α -cobratoxin indicating the $\alpha 7$ nAChR role in maintaining the proliferative potential of DT40 cells. Nicotine and choline potentiated the effect of 0.5 μ M ionomycin, which suppresses cell viability via Ca^{2+} ions influx. Contrariwise, the suppressive effect of 1 μ M hydrogen peroxide, mainly affecting cell mitochondria, was weakened by choline, but was increased by 2.5 nM MLA. MEK1/2 and PKC kinases activity was necessary for maintaining the proliferative potential of DT40 cells. MLA increased the effect of the MEK1/2 kinase inhibitor (U0126), while suppressive effect of MLA itself was decreased. The presence of CaMKII kinase inhibitor (KN-62) also decreased MLA effect. MLA favoured cell survival in the presence of PKC inhibitor (chelerythrine). These data indicate that MEK1/2 and CaMKII kinases are involved in $\alpha 7$ -containing nAChR signaling in DT40 cells and that PKC plays a key role in this process.

Key words: nicotinic acetylcholine receptor, proliferation, DT40 cell line, MEK 1/2, PKC.

1. Sharma G., Vijayaraghavan S. // J Neurobiol. — 2002. — 53. — P. 524–534.
2. Romanelli N., Gratteri P., Guandalini L. et al. // Chemmedchem. — 2007. — 2. — P. 2–24.

3. Skok M. V., Kalashnik E. N., Koval L. N. et al. // *Mol. Pharmacology*. – 2003. – **64**. – P. 885–889.
4. Коваль Л. Н., Романюк С. І., Колибо Д. В. та ін. // *Укр. біохім. журн.* – 2005. – **77**, № 2. – С. 104–110.
5. Skok M. V., Grailhe R., Changeux J. P. // *Eur. J. Pharmacol.* – 2005. – **517**. – P. 246–251.
6. Кухтина В. В., Вайзе К., Осипов А. В. та ін. // *Биоорган. химия*. – 2000. – **26**. – С. 803–807.
7. Koval L. M., Zverkova A. S., Grailhe R. et al. // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* – 2008. – **40**. – P. 980–990.
8. Skok M. V., Voitenko L. P., Voitenko S. V. et al. // *Neuroscience*. – 1999. – **93**. – P. 1427–1436.
9. Koval O. M., Voitenko L. P., Skok M. V. et al. // *Neurosci. Lett.* – 2004. – **365**. – P. 143–146.
10. Kim S., Humphries E. H., Tjoelker L. et al. // *Mol. Cell. Biol.* – 1990. – **10**. – P. 3224–3231.
11. Peng X., Gerzanich V., Anand R. et al. // *Mol. Pharmacol.* – 1997. – **51**. – P. 776–784.
12. Seguela P., Wadiche J., Dineley-Miller K. et al. // *J. Neurosci.* – 1993. – **13**. – P. 596–604.
13. Heeschen C., Jang J. J., Weis M. et al. // *Nat. Med.* – 2001. – **7**. – P. 833–839.
14. Alkondon M., Pereira E. F., Wonnacott S. et al. // *Mol. Pharmacol.* – 1992. – **41**. – P. 802–808.
15. Liu W. C., Slusarchyk D. S., Astle G. et al. // *J. Antibiot.* – 1978. – **31**. – P. 815–819.
16. Гребиньк Д. М., Коваль Т. В., Матышевская О. П. // *Укр. біохім. журн.* – 2004. – **76**, № 6. – С. 63–69.
17. Xie Y. X., Bezard E., Zhao B. L. // *J. Biol. Chem.* – 2005. – **280**. – P. 32405–32412.
18. Suzuki H., Matsuda S., Terauchi Y. // *Nat. Immunol.* – 2003. – **4**. – P. 280–286.
19. Altman A., Mally M. I., Isakov N. // *Immunology*. – 1992. – **76**. – P. 465–471.
20. Dajas-Bailador F., Wonnacott S. // *Trends Pharmacol. Sci.* – 2004. – **25**. – P. 317–324.
21. Shaw S., Bencherif M., Marrero M. B. // *J. Biol. Chem.* – 2002. – **277**. – P. 44920–44924.
22. Wang H., Sun X. // *Brain Research Reviews*. – 2005. – **48**. – P. 420–437.
23. Chernyavsky A. I., Arredondo J., Marubio L. M., Grando S. A. // *J. Cell Sci.* – 2004. – **117**. – P. 5665–5679.
24. Kawashima K., Fujii T. // *J. Pharm. Sci.* – 2008. – **106**. – P. 167–173.
25. Singh S. P., Kalra R., Puttfarcken P. et al. // *Toxicol. App. Pharmacol.* – 2000. – **164**. – P. 65–72.
26. Kawashima K., Fujii T. // *Frontiers in Bioscience*. – 2004. – **9**. – P. 2063–2085.

Отримано 23.10.2008