

ВЛИЯНИЕ ИНГИБИТОРОВ ФОСФАТИДИЛИНОЗИТОЛКИНАЗ НА ДЕПОЗАВИСИМЫЙ ВХОД Ca^{2+} В МАКРОФАГИ

© Л. С. Курилова, З. И. Крутецкая, О. Е. Лебедев

Кафедра биофизики С.-Петербургского государственного университета;
электронный адрес: *cozzy@mail.ru*

С использованием флуоресцентного Ca^{2+} -чувствительного зонда Fura-2AM исследовано участие фосфатидилинозитолкиназы (ФИ-киназы) в регуляции депозависимого входа Ca^{2+} , вызванного пуринергическим агонистом АТФ и ингибитором эндоплазматических Ca^{2+} -АТФаз тапсигаргином в перитонеальных макрофагах крысы. Показано, что два структурно различных ингибитора ФИ-3-киназы и ФИ-4-киназы вортманнин и соединение LY294002 вызывают дозозависимое ингибирование входа Ca^{2+} , индуцированного тапсигаргином или АТФ. Полученные данные свидетельствуют о том, что ФИ-3-киназа и ФИ-4-киназа играют важную роль в активации депозависимого входа Ca^{2+} в макрофаги, причем их действие может быть опосредовано влиянием на элементы актинового цитоскелета. Результаты свидетельствуют в пользу модели емкостного входа Ca^{2+} «связывание по типу секреции», предполагающей обратимую транслокацию внутриклеточного депо Ca^{2+} к плазматической мембране, происходящую с участием актиновых филаментов и ФИ-киназ.

Ключевые слова: перитонеальные макрофаги, депозависимый вход Ca^{2+} , фосфатидилинозитолкиназы, вортманнин, LY294002.

Принятые сокращения: $[\text{Ca}^{2+}]_i$ — внутриклеточная концентрация Ca^{2+} , ФИ — фосфатидилинозитол.

В настоящее время предполагают, что одним из основных механизмов регулируемого входа Ca^{2+} в электрически невозбудимые клетки является так называемый депозависимый, или «емкостной», вход Ca^{2+} . В соответствии с моделью «емкостного» входа Ca^{2+} (Putney, 1990; Berridge, 1995; Putney et al., 2001; Parekh, Putney, 2005), вход Ca^{2+} регулируется степенью заполнения Ca^{2+} -депо таким образом, что опустошение депо активирует вход Ca^{2+} . В то же время механизмы, с помощью которых информация об опустошении депо передается к Ca^{2+} -каналам в плазматической мембране, до сих пор остаются неясными.

С использованием модификаторов актинового цитоскелета (цитохалазинов, фаллоидина, латрункулина В и джасплакинолида) и ингибитора везикулярного транспорта брефельдина А нами ранее было показано, что актиновые филаменты и G-белки малой молекулярной массы семейства arf, необходимые для механизма везикулярного транспорта в целом, являются важными регуляторными участниками депозависимого входа Ca^{2+} в перитонеальные макрофаги крысы (Крутецкая и др., 2001; Курилова и др., 2006). Полученные данные свидетельствуют в пользу модели депозависимого входа Ca^{2+} «связывание по типу секреции» (secretion-like coupling model) (Patterson et al., 1999; Rosado, Sage, 2000b), предполагающей обратимую транслокацию внутриклеточного Ca^{2+} -депо к плазматической мембране, происходящую с участием микрофиламентов и белков arf.

Известно, что фосфоинозитиды являются универсальными сигнальными молекулами в эукариотических клет-

ках. Так, ФИ-4, 5-дифосфат составляет 3 % от общего числа кислых липидов и более чем 99 % от дважды фосфорилированных производных ФИ в клетках млекопитающих (McLaughlin et al., 2002). ФИ-4, 5-дифосфат заякоривает различные сигнальные молекулы и элементы цитоскелета на мембране, а метаболизм ФИ-4, 5-дифосфата тесно связан с мембранным транспортом. Относительно недавно установлено, что ФИ-4, 5-дифосфат регулирует активность ионных каналов различных типов (Hilgemann et al., 2001; Suh, Hille, 2005). Обнаружено, что фосфоинозитиды мембран играют ключевую роль в реорганизации актиновых филаментов в клетках различных типов (Janmey, 1994; Ma, Abrams, 1999). Так, действие фосфоинозитид-специфических киназ, таких как фосфатидилинозитол-3-киназа (ФИ-3-киназа) и фосфатидилинозитол-4-киназа (ФИ-4-киназа), играющих ключевую роль в метаболизме фосфоинозитидов, приводит к динамической реорганизации актиновых филаментов (Rameh, Cantley, 1999; Cantrell, 2001; Cantley, 2002; Foster et al., 2003).

ФИ-3- и ФИ-4-киназы и их продукты обнаружены во всех эукариотических клетках, включая клетки крови (Wymann et al., 2000; Stephens et al., 2002). Так, в перитонеальных макрофагах мыши идентифицированы ФИ-3-киназы класса 1A, играющие важную роль в процессах хемотаксиса и фагоцитоза (Wymann et al., 2000; Stephens et al., 2002; Sakai et al., 2006). Установлено, что киназы ФИ-3 и ФИ-4 регулируются малыми G-белками, такими как Ras и Rho (Gasman et al., 1998). С другой стороны, ФИ-3-киназа может также активировать белки Ras

(Balla, 1998; Vanhaesebroeck, Waterfield, 1999; Cantrell, 2001).

Выделяют два различных пути передачи сигнала, включающие в себя участие фосфоинозитидов. Так, в классическом фосфоинозитидном каскаде ФИ-4-киназа фосфорилирует мембранные фосфолипиды в положении С-4, в результате чего образуется ФИ-4, 5-дифосфат, являющийся субстратом для фосфолипазы С. С другой стороны, фосфоинозитиды могут быть фосфорилированы в положении С-3 другим ферментом — ФИ-3-киназой, что приводит к образованию различных липидных мессенджеров, таких как ФИ-3-фосфат, ФИ-3, 4-дифосфат и ФИ-3, 4, 5-трифосфат, которые не являются субстратом для фосфолипазы С (Cantrell, 2001). Показано, что ФИ-4-фосфат и ФИ-4, 5-дифосфат влияют на организацию цитоскелета путем взаимодействия с некоторыми актинсвязывающими белками, а ФИ-3, 4-дифосфат и ФИ-3, 4, 5-трифосфат могут вызывать освобождение концов актиновых филаментов, способствуя тем самым их полимеризации (Hartwig et al., 1996).

Кроме того, установлено, что ФИ-киназы, в первую очередь ФИ-3-киназы, и их липидные продукты играют важную роль в регуляции везикулярного транспорта и секреции (Wymann et al., 2003; Roth, 2004).

В связи с этим в настоящей работе на перитонеальных макрофагах крысы изучали роль ФИ-киназ в регуляции депозависимого входа Ca^{2+} в клетки. Исследовали влияние двух структурно различных ингибиторов ФИ-3- и ФИ-4-киназы вортманнина и LY294002 на Ca^{2+} -сигналы, индуцированные пуринергическим агонистом АТФ и ингибитором эндоплазматических Ca^{2+} -АТФаз тапсигаргином.

Материал и методика

Эксперименты проводили на культивируемых резидентных перитонеальных макрофагах крысы. Кварцевые стекла с клетками помещали в экспериментальную камеру, заполненную физиологическим раствором следующего ионного состава (в мМ): NaCl — 140, KCl — 5, $CaCl_2$ — 1, $MgCl_2$ — 1, HEPES-NaOH — 5, pH 7.3—7.4. Бескальциевая среда содержала 0 мМ $CaCl_2$ и 1 мМ ЭГТА. Подробно процедуру культивирования макрофагов описана ранее (Крутецкая и др., 1997).

В опытах применяли реактивы фирмы Sigma (США). Маточные растворы тапсигаргина (500 мМ), вортманнина (1 мМ) и соединения LY294002 (2-(4-морфолинил)-8-фенил-4Н-1-бензопиран-4-он; 2-(4-морфолинил)-8-фенилхромон) (50 мМ) готовили в диметилсульфоксиде. Маточный раствор АТФ (100 мМ) готовили на воде. Для измерения внутриклеточной концентрации кальция ($[Ca^{2+}]_i$) использовали флуоресцентный зонд Fura-2АМ. Макрофаги инкубировали в физиологическом растворе, содержащем 2 мМ Fura-2АМ, в течение 45 мин при комнатной температуре.

Стекла с окрашенными клетками отмывали физиологическим раствором и переносили в экспериментальную камеру, расположенную на столике люминесцентного микроскопа Люмам-КФ (ЛЮМО, Санкт-Петербург). Флуоресценцию Fura-2АМ возбуждали при 337 нм с помощью азотного лазера ЛГИ-503. Лазер располагали сбоку от микроскопа под углом 30° к экспериментальной камере, что позволяло направить луч лазера непосредственно на объект. Интенсивность флуоресценции регистрирова-

ли с помощью спектрофотонасадки СФН-10 при длине волны 510 нм. Сигнал с ФЭУ-79 усиливали специально сконструированным усилителем и регистрировали на компьютере IBM PC с использованием оригинального программного обеспечения. В экспериментах использовали объектив 10× с апертурой 0.4. При данном увеличении в площадь фотометрируемого участка попадало 40—50 клеток. Для избежания фотовыгорания измерения проводили через каждые 20 с облучением объекта в течение 2.5 с. При добавлении АТФ клетки облучали непрерывно до достижения максимума флуоресценции. Значения $[Ca^{2+}]_i$ рассчитывали по уравнению Гринкевича (Grynkiewicz et al., 1985). Эксперименты проводили при комнатной температуре (22—24 °С) на 2—3-и сут культивирования клеток.

В экспериментах использовали два подхода. В первом исследовали влияние фармакологических агентов на Ca^{2+} -ответ, вызываемый АТФ или тапсигаргином, в макрофагах, находящихся в нормальном физиологическом растворе. Агенты вводили либо до действия агонистов, либо после, во время фазы плато Ca^{2+} -сигнала, отражающей вход Ca^{2+} из наружной среды. Во втором варианте опытов для выявления и усиления входа Ca^{2+} в клетки использовали следующую схему эксперимента. Макрофаги инкубировали в номинально бескальциевой среде, затем на них действовали одним из агонистов, вызывая мобилизацию Ca^{2+} из внутриклеточных депо. После добавления в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} и восстановления физиологического градиента концентрации Ca^{2+} наблюдалось быстрое повышение $[Ca^{2+}]_i$, отражающее вход Ca^{2+} в клетку. Вортманнин и LY294002 добавляли до введения агонистов или во время развивающегося входа Ca^{2+} из наружной среды.

Результаты

Добавление к перитонеальным макрофагам 200 мМ АТФ вызывает двухфазный Ca^{2+} -сигнал: кратковременный пик, связанный с мобилизацией Ca^{2+} из депо, и выраженное длительное «плато», отражающее вход Ca^{2+} в клетку (Alonso-Torre, Trautmann, 1993) (рис. 1, а, в).

Специфический ингибитор эндоплазматических Ca^{2+} -АТФаз тапсигаргин (0.5 мМ) (Thastrup et al., 1989) также вызывает двухфазный Ca^{2+} -сигнал: менее быстрый и не очень выраженный пик, связанный с мобилизацией Ca^{2+} из депо, и длительную фазу, отражающую депозависимый вход Ca^{2+} из наружной среды (рис. 1, б, з).

Исследовано влияние эффективного ингибитора ФИ-3- и ФИ-4-киназ вортманнина (100 нМ, 0.5 мМ), выделяемого из *Penicillium wortmanni* (Nakanishi et al., 1995; Walker et al., 2000), на Ca^{2+} -сигналы, индуцированные ингибитором эндоплазматических Ca^{2+} -АТФаз тапсигаргином и пуринергическим агонистом АТФ, в перитонеальных макрофагах крысы. Установлено, что в концентрации 100 нМ вортманнин не влияет на фазу мобилизации Ca^{2+} из депо и незначительно (на 20—30 %) подавляет вход Ca^{2+} в макрофаги, индуцированный АТФ или тапсигаргином. На рис. 2, а представлено влияние 100 нМ вортманнина на Ca^{2+} -сигналы, индуцированные АТФ, в перитонеальных макрофагах. Клетки предварительно инкубировали в течение 5 мин со 100 нМ вортманнина в нормальном физиологическом растворе, затем стимулировали 200 мМ АТФ. Видно, что вортманнин в данной концентрации не влияет на фазу мобилизации Ca^{2+} из

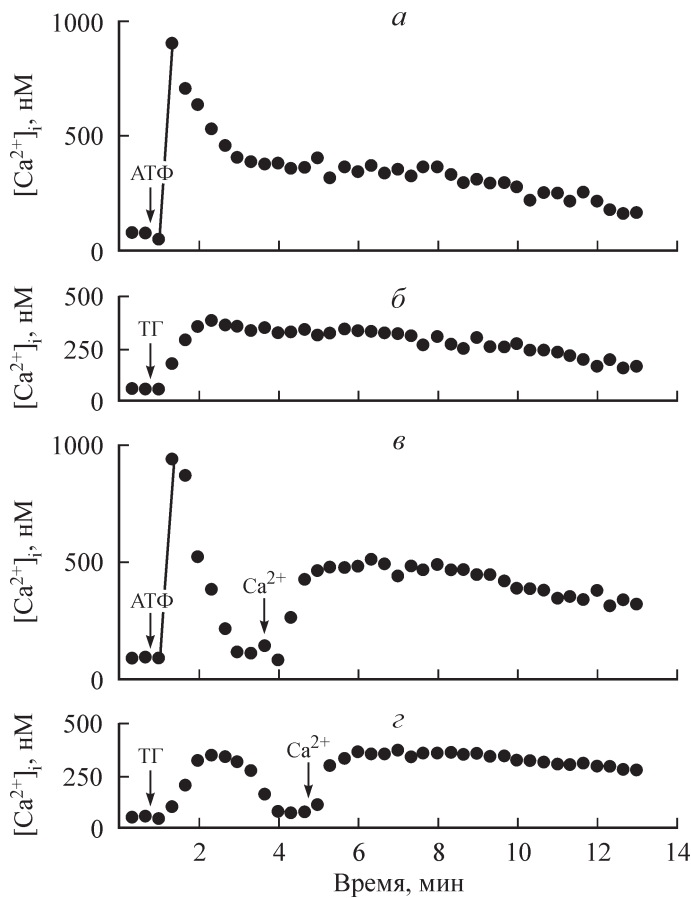


Рис. 1. Ca^{2+} -сигналы, индуцированные АТФ (а, в) и тапсигаргином (ТГ; б, з), в перитонеальных макрофагах.

Здесь и на рис. 2—4: по оси абсцисс — время, мин; по оси ординат — концентрация Ca^{2+} в цитозоле, нМ. а, б — клетки стимулировали 200 мкМ АТФ (а) или 0.5 мкМ ТГ (б) в нормальном физиологическом растворе; в, з — клетки стимулировали 200 мкМ АТФ (в) или 0.5 мкМ ТГ (з) в номинально бескальциевой среде, вход Ca^{2+} инициировали введением в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} .

депо и лишь незначительно подавляет депозависимый вход Ca^{2+} , индуцированный АТФ.

На рис. 2, б—з показано влияние 0.5 мкМ вортманнина на Ca^{2+} -сигналы, индуцированные АТФ или тапсигаргином, в макрофагах. Предварительная инкубация клеток с 0.5 мкМ вортманнина в течение 5 мин до стимуляции клеток 0.5 мкМ тапсигаргина в нормальном физиологическом растворе не оказывала влияния на фазу мобилизации Ca^{2+} из депо, но вызывала практически полное подавление депозависимого входа Ca^{2+} (рис. 2, б). Сходные результаты получены с использованием бескальциевой среды. В опытах, показанных на рис. 2, в, з, макрофаги стимулировали 200 мкМ АТФ (рис. 2, в) или 0.5 мкМ тапсигаргина (рис. 2, з) в номинально бескальциевой среде. После окончания фазы мобилизации Ca^{2+} из депо вход Ca^{2+} индуцировали введением в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} . Видно, что предварительная инкубация клеток с 0.5 мкМ вортманнина в течение 5 мин до введения АТФ приводит к практически полному подавлению фазы входа Ca^{2+} в макрофаги (рис. 2, в). Добавление 0.5 мкМ вортманнина на фоне развившегося входа Ca^{2+} , индуцированного тапсигаргином (рис. 2, з), вызывает постепенное снижение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ до базального уровня. Это свидетельствует о том,

что вортманнин подавляет также и уже развившийся вход Ca^{2+} в макрофаги.

Во всех вариантах экспериментов показано, что соединение LY294002 вызывает дозозависимое подавление входа Ca^{2+} , индуцированного тапсигаргином или АТФ. Предварительная инкубация макрофагов в течение 15—30 мин с LY294002 в низкой концентрации (10 мкМ), при которой происходит специфическое ингибирование ФИ-3-киназы (Vlahos et al., 1994), приводит к незначительному (на 20—30 %) ингибированию депозависимого входа Ca^{2+} в макрофаги (рис. 3). В то же время при воздействии LY294002 в более высоких концентрациях (50 и 100 мкМ), при которых происходит ингибирование и ФИ-4-киназы, наблюдается практически полное подавление входа Ca^{2+} , индуцированного АТФ или тапсигаргином (рис. 4).

LY294002 во всех исследованных концентрациях не влиял на фазу мобилизации Ca^{2+} -сигналов, вызванных тапсигаргином (рис. 3, б; 4, б, з). В концентрации 10 мкМ LY294002 не оказывает существенного влияния на фазу

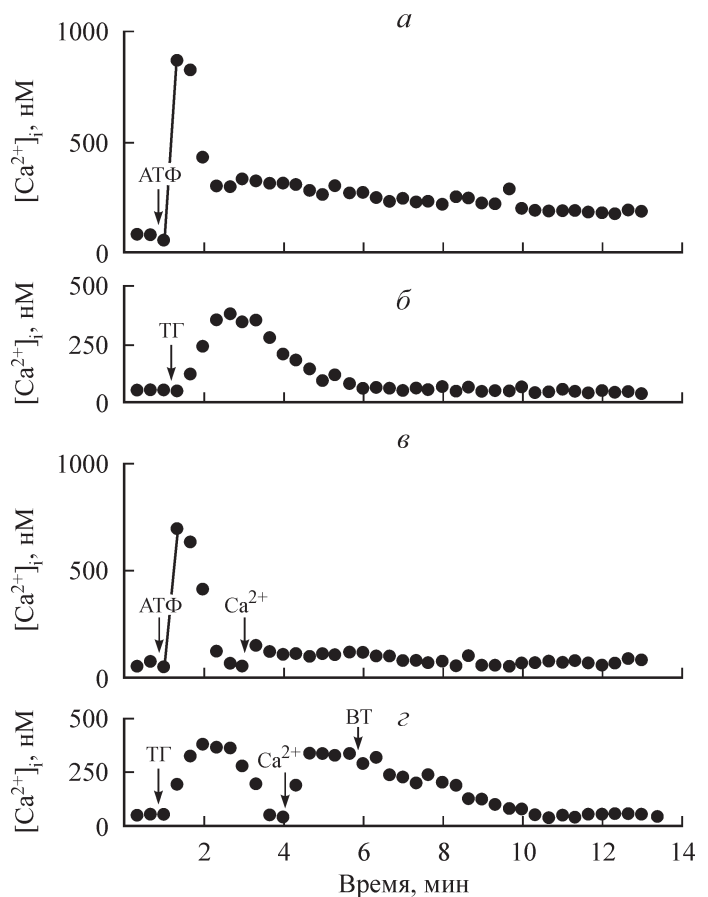


Рис. 2. Влияние вортманнина (ВТ) на Ca^{2+} -сигналы, вызванные АТФ или тапсигаргином, в макрофагах.

а, б — макрофаги, находящиеся в нормальном физиологическом растворе, предварительно инкубировали в течение 5 мин в присутствии 100 нМ (а) или 0.5 мкМ (б) ВТ, затем стимулировали 200 мкМ АТФ (а) или 0.5 мкМ ТГ (б); в — клетки инкубировали в течение 5 мин в присутствии 0.5 мкМ ВТ в номинально бескальциевой среде, затем стимулировали 200 мкМ АТФ, после чего вход Ca^{2+} инициировали введением в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} ; з — макрофаги стимулировали 0.5 мкМ ТГ в номинально бескальциевой среде, вход Ca^{2+} инициировали введением в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} , 0.5 мкМ ВТ добавляли во время развившегося входа Ca^{2+} .

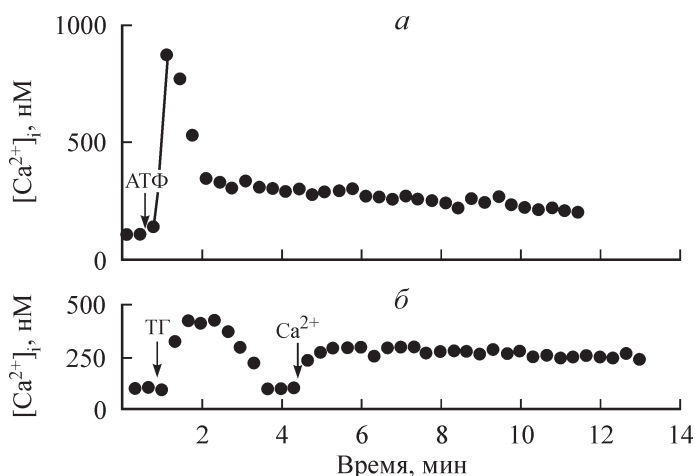


Рис. 3. Влияние соединения LY294002 в концентрации 10 мкМ на Ca^{2+} -сигналы, индуцированные АТФ или тапсигаргином, в макрофагах.

a — макрофаги, находящиеся в нормальном физиологическом растворе, предварительно инкубировали в течение 15 мин в присутствии 10 мкМ LY294002, затем стимулировали 200 мкМ АТФ; *б* — клетки инкубировали в течение 15 мин с 10 мкМ LY294002 в номинально бескальциевой среде, затем стимулировали 0.5 мкМ ТГ, после чего вход Ca^{2+} индуцировали введением в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} .

мобилизации Ca^{2+} -сигналов, вызванных АТФ (рис. 3, *a*). В то же время при добавлении к макрофагам LY294002 в концентрации 50 или 100 мкМ наблюдается значительное (на 40—70 %) уменьшение фазы мобилизации Ca^{2+} -сигналов, индуцируемых АТФ (рис. 4, *a, в*). Это связано, по-видимому, с тем, что LY294002 в концентрации 50—100 мкМ влияет на активность ФИ-4-киназы, регулирующей синтез агонист-чувствительного пула фосфоинозитидов, лимитируя тем самым количество ФИ-4, 5-дифосфата, доступного для фосфолипазы С и образования Ca^{2+} -мобилизующего мессенджера инозитол-1, 4, 5-трифосфата.

Обсуждение

Наши данные согласуются с результатами, полученными на тромбоцитах человека (Jenner et al., 1996; Rosado, Sage, 2000a, 2000b). Так, показано, что ингибиторы ФИ-3- и ФИ-4-киназ вортманнин и LY294002 не влияют на мобилизацию Ca^{2+} из депо, но значительно подавляют депозависимый вход Ca^{2+} , индуцированный тапсигаргином (Rosado, Sage, 2000a, 2000b). Обработка тромбоцитов соединением LY294002 в концентрации 10 мкМ, в которой оно влияет на активность ФИ-3-киназы, не влияет на мобилизацию Ca^{2+} из депо, вызываемую физиологическим агонистом тромбином. В то же время при воздействии LY294002 в концентрации 100 мкМ наблюдается заметное подавление (на 26 %) фазы мобилизации Ca^{2+} из депо, индуцируемой тромбином (Rosado, Sage, 2000a, 2000b). На ацинарных клетках поджелудочной железы крысы обнаружено, что вортманнин и LY294002 подавляют обе фазы Ca^{2+} -сигнала, индуцированного холецистокинином или карбахолом, но не влияют на мобилизацию, вызванную тапсигаргином (Fischer et al., 2004). Вортманнин и LY294002 подавляют также вход Ca^{2+} , индуцированный хемокином, в клетках китайского хомячка (Kansra et al., 2001). Кроме того, ингибиторы ФИ-3- и ФИ-4-киназ

вортманнин и LY294002 подавляют антигенстимулируемый вход Ca^{2+} в Т-клетках линии Jurkat (Hsu et al., 2000) и лейкоцитарных базофилах линии RBL-2H3 (Ching et al., 2001). На клетках китайского хомячка показано также, что предварительная инкубация клеток с вортманнином или LY294002 вызывает уменьшение депозависимого входа Ca^{2+} , индуцированного эндотелином-1. Однако добавление вортманнина или LY294002 после стимуляции клеток эндотелином-1 не приводит к подавлению входа Ca^{2+} . По-видимому, в данном случае ФИ-3-киназа необходима для активации, но не для поддержания депозависимого входа Ca^{2+} (Kawanabe et al., 2002). В то же время вортманнин и LY294002 практически не влияют на мобилизацию из депо и вход Ca^{2+} , индуцированные лейкотриеном B_4 , в лейкоцитарных базофилах линии RBL-2H3 крысы (Ito et al., 2002).

Результаты наших экспериментов с использованием вортманнина и LY294002 свидетельствуют о том, что ФИ-3- и ФИ-4-киназы играют важную роль в активации депозависимого входа Ca^{2+} в макрофаги. Однако то, что оба блокатора действуют менее эффективно в малых концентрациях, которые специфически ингибируют ФИ-3-киназы, позволяет предположить, что ФИ-4-киназа

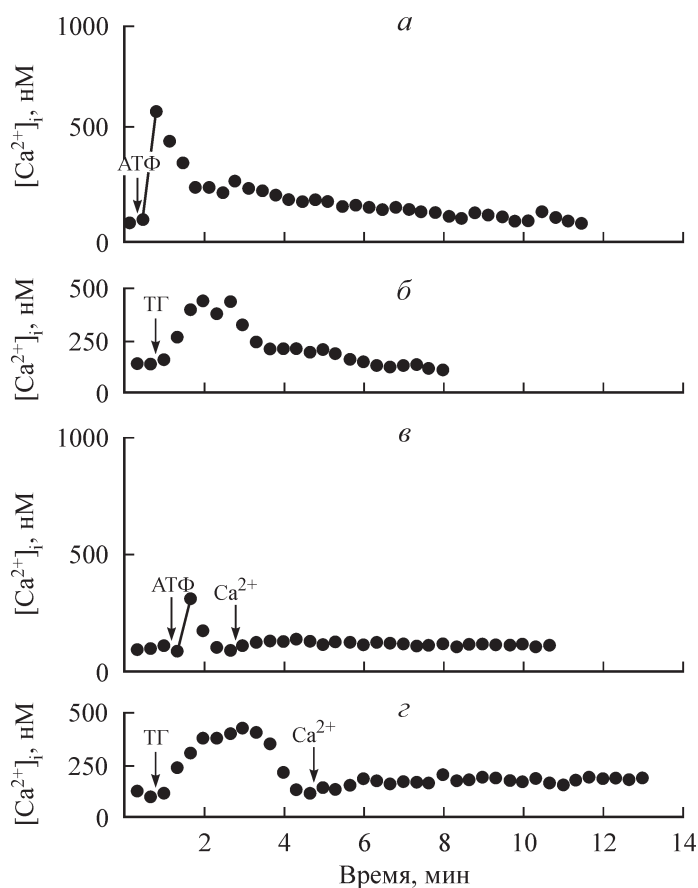


Рис. 4. Влияние соединения LY294002 в концентрации 50 или 100 мкМ на Ca^{2+} -сигналы, индуцированные АТФ или тапсигаргином, в макрофагах.

a, б — клетки предварительно инкубировали в течение 15 мин в присутствии 50 мкМ LY294002 в нормальном физиологическом растворе, затем стимулировали 200 мкМ АТФ (*a*) или 0.5 мкМ ТГ (*б*); *в, г* — клетки инкубировали в течение 15 мин в присутствии 100 мкМ LY294002 в бескальциевой среде, затем стимулировали 200 мкМ АТФ (*в*) или 0.5 мкМ ТГ (*г*) и вводили в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} .

в большей степени, чем ФИ-3-киназа, влияет на активацию депозависимого входа Ca^{2+} в клетках этого типа. Возможно также, что ФИ-4-киназа может ослаблять ингибирование ФИ-3-киназы, фосфорилируя ФИ-3-фосфат, остающийся в клетке (Rosado, Sage, 2000a).

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о том, что синтез фосфоинозитидов необходим для активации депозависимого входа Ca^{2+} в макрофаги. Активность ФИ-3- и ФИ-4-киназ может являться одним из факторов, участвующих в регуляции пула фосфоинозитидов, необходимого для активации депозависимого входа Ca^{2+} , причем действие киназ может быть опосредовано влиянием на элементы актинового цитоскелета, как это было показано на тромбоцитах человека (Rosado, Sage, 2000a, 2000b). В пользу этого свидетельствуют также данные о том, что ФИ-3-киназы вызывают реорганизацию актиновых филаментов в перитонеальных макрофагах мыши (Miller et al., 2003; Allen et al., 2005).

Можно также предположить, что ФИ-киназы или фосфорилированные производные ФИ, образующиеся при действии этих киназ, могут прямо взаимодействовать с депозависимыми Ca^{2+} -каналами и модулировать их активность. Обнаружено, что представители трех основных семейств (TRPC, TRPM и TRPV) большого суперсемейства TRP (transient receptor potential)-каналов, большая часть которых активируется при опустошении депо, содержат один или несколько участков связывания SH_2 -домена ФИ-3-киназы (Li et al., 2002; Nilius, 2003; Pedersen et al., 2005). Возможна также прямая модуляция активности TRP-каналов фосфорилированными производными ФИ. Так, показано, что ФИ-4, 5-дифосфат прямо связывается с TRPV1-каналом в нейронах и ингибирует его активность (Chuang et al., 2001; Clapham, 2003; Prescott, Julius, 2003; Dubyak, 2004; Clapham et al., 2005). В то же время ФИ-4, 5-дифосфат активирует TRPM5-каналы (Liu, Liman, 2003) и TRPM4-каналы (Zhang et al., 2005; Nilius et al., 2006), экспрессированные в клетках линии НЕК-293, TRPM7-каналы в клетках сердца крысы (Runnels et al., 2002; Clapham, 2003), TRPV5-каналы в клетках эпителия почки (Lee et al., 2005) и TRPM8-каналы, экспрессированные в ооцитах *Xenopus* (Liu, Qin, 2005; Rohacs et al., 2005; Balla, 2006). Показано, что чувствительность TRPM8- и TRPM5-каналов к ФИ-4, 5-дифосфату связана с присутствием высококонсервативного TRP-домена, локализованного в проксимальной части С-терминального фрагмента каналов. Предполагают, что TRP-домен может служить участком связывания ФИ-4, 5-дифосфата и что регуляция ФИ-4, 5-дифосфатом может являться общим свойством суперсемейства TRP-каналов (Pedersen et al., 2005; Rohacs et al., 2005).

Продукт ФИ-3-киназы ФИ-3, 4, 5-трифосфат также выступает в качестве липидного мессенджера и активирует TRPC6-каналы, экспрессированные в клетках линии НЕК-293 (Tseng et al., 2004). Многие каналы семейства TRPC широко экспрессированы в клетках крови. В связи с этим поиск специфических ингибиторов Ca^{2+} -каналов, активируемых ФИ-3, 4, 5-трифосфатом, может иметь практическое значение для терапии болезней крови.

Потенциалзависимые Ca^{2+} -каналы также являются мишенью для ФИ-киназ и фосфорилированных производных ФИ, образующихся при их действии. На кардиомиоцитах мыши показано, что ингибирование Ca^{2+} -каналов L-типа α_1 -субъединицей G_q -белка опосредовано ингибированием ФИ-3-киназы (Lu et al., 2005). Рецепторзависимая активация Ca^{2+} -каналов L-типа в нейронах (Blair,

Marshall, 1997) и миоцитах сосудов крысы (Viard et al., 1999; Macrez et al., 2001; Quignard et al., 2001; Steinberg, 2001; Callaghan et al., 2004) опосредована активацией ФИ-3-киназы. На миоцитах воротной вены крысы обнаружено, что продукт ФИ-3-киназы ФИ-3, 4, 5-трифосфат прямо активирует Ca^{2+} -каналы L-типа (Le Blanc et al., 2004). Установлено также, что ФИ-4, 5-дифосфат необходим для полноценной активности Ca^{2+} -каналов P/Q-типа в нейронах лягушки (Wu et al., 2002) и Ca^{2+} -каналов N-типа в симпатических нейронах крысы (Gamper et al., 2004).

Известно, что ФИ-киназы и их липидные продукты играют важную роль в регуляции везикулярного транспорта и секреции (Roth, 2004). В соответствии с этим обнаружено, что в клетках линии НЕК-293 ФИ-3-киназы участвуют в вызванной эпидермальным фактором роста транслокации везикул, содержащих TRPC5-каналы, из подмембранного пула к плазмалемме и встраивании каналов в мембрану (Bezzarides et al., 2004). На нейронах крысы показано, что активация ФИ-3-киназ способствует транслокации к плазмалемме потенциалзависимых Ca^{2+} -каналов N-типа (Viard et al., 2004).

Таким образом, результаты настоящей работы свидетельствуют об участии ФИ-3- и ФИ-4-киназ в активации и регуляции депозависимого входа Ca^{2+} в перитонеальные макрофаги крысы. Ранее нами было показано, что актиновые филаменты и малые G-белки семейства *arG*, необходимые для механизма везикулярного транспорта в целом, являются важными регуляторными участниками депозависимого входа Ca^{2+} в макрофаги (Крутецкая и др., 2001; Курилова и др., 2006). Реорганизация элементов цитоскелета может участвовать в процессе транслокации Ca^{2+} -депо к плазматической мембране, *arG*-белки также вовлечены в этот процесс. С другой стороны, реорганизация цитоскелета, расположенного непосредственно под плазмалеммой клетки, может регулировать связывание между IP_3 -рецептором и депозависимым Ca^{2+} -каналом в плазматической мембране. Роль малых G-белков в механизме реорганизации актинового цитоскелета может быть дополнена или даже опосредована активацией ФИ-3- и ФИ-4-киназ, приводящей к синтезу фосфоинозитидов. По-видимому, все эти компоненты тесно связаны и вовлечены в комплексный сигнальный каскад, приводящий к депозависимому входу Ca^{2+} в макрофагах и других невозбудимых клетках.

На основании результатов, полученных в настоящей работе и ранее (Крутецкая и др., 2001; Курилова и др., 2006), можно заключить, что наиболее вероятной моделью емкостного входа Ca^{2+} в перитонеальные макрофаги крысы является модель «связывание по типу секреции», предполагающая обратимую транслокацию Ca^{2+} -депо к плазматической мембране, происходящую с участием актиновых филаментов, белков *arG* и ФИ-киназ.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 03-04-49091) и Министерства образования РФ (грант 4681; 2005).

Список литературы

- Крутецкая З. И., Лебедев О. Е., Крутецкая Н. И., Курилова Л. С. 2001. Роль структур цитоскелета в регуляции Ca^{2+} -ответов в макрофагах. Цитология. 43 (1) : 61—71.
Крутецкая З. И., Лебедев О. Е., Тюшев В. Е., Крутецкая Н. И., Рощина Н. Г. 1997. Влияние ингибиторов тирозинки-

наз и тирозинфосфатаз на вход Ca^{2+} , индуцируемый АТФ и тапсигаргином, в перитонеальных макрофагах крысы. Цитология. 39 (2/3) : 164—176.

Курилова Л. С., Крутецкая З. И., Лебедев О. Е. 2006. Влияние латрункулина В, джасплакинолида и брефельдина А на депозависимый вход Ca^{2+} в макрофаги. Цитология. 48 (10) : 867—874.

Allen L.-A. H., Allgood J. A., Han X., Wittine L. M. 2005. Phosphoinositide 3-kinase regulates actin polymerization during delayed phagocytosis of *Helicobacter pylori*. J. Leukocyte Biol. 78 : 220—230.

Alonso-Torre S. R., Trautmann A. 1993. Calcium responses elicited by nucleotides in macrophages. Interaction between two receptor subtypes. J. Biol. Chem. 268 : 18 640—18 647.

Balla T. 1998. Phosphatidylinositol 4-kinases. Biochim. biophys. acta. 1436 : 69—85.

Balla T. 2006. Phosphoinositide-derived messengers in endocrine signaling. J. Endocrinol. 188 : 135—153.

Berridge M. J. 1995. Capacitative calcium entry. Biochem. J. 312 : 1—11.

Bezzerides V. J., Ramsey I. S., Kotecha S., Greka A., Clapham D. E. 2004. Rapid vesicular translocation and insertion of TRP channels. Nat. Cell Biol. 6 : 709—720.

Blair L. A., Marshall J. 1997. IGF-1 modulates N and L calcium channels in a PI3-kinase-dependent manner. Neuron. 19 : 421—429.

Callaghan B., Koh S. D., Keef K. D. 2004. Muscarinic M2 receptor stimulation of Cav1.2b requires phosphatidylinositol 3-kinase, protein kinase C and c-src. Circ. Res. 94 : 626—633.

Cantley L. C. 2002. The phosphoinositide 3-kinase pathway. Science. 296 : 1655—1657.

Cantrell D. A. 2001. Phosphoinositide 3-kinase signaling pathways. J. Cell Sci. 114 : 1439—1445.

Ching T.-T., Hsu A.-L., Johnson A. J., Chen Ch.-S. 2001. Phosphoinositide 3-kinase facilitates antigen-stimulated Ca^{2+} influx in RBL-2H3 mast cells via a phosphatidylinositol 3, 4, 5-trisphosphate-sensitive Ca^{2+} entry mechanism. J. Biol. Chem. 276 : 14 814—14 820.

Chuang H., Prescott E. D., Kong H., Shields S., Jordt S.-E., Basbaum A. I., Chao M. V., Julius D. 2001. Bradykinin and nerve growth factor release the capsaicin receptor from PtdIns (4, 5) P_2 -mediated inhibition. Nature. 411 : 957—962.

Clapham D. E. 2003. TRP channels as cellular sensors. Nature. 426 : 517—524.

Clapham D. E., Julius D., Montell C., Schultz G. 2005. International union of pharmacology. XLIX. Nomenclature and structure-function relationships of transient receptor potential channels. Pharmacol. Rev. 57 : 427—450.

Dubyak G. R. 2004. Ion homeostasis, channels, and transporters: an update on cellular mechanisms. Adv. Physiol. Educ. 28 : 143—154.

Fischer L., Gukovskaya A. S., Young S. H., Gukovsky I., Lugea A., Buechler P., Penninger J. M., Friess H., Pandolfi S. J. 2004. Phosphatidylinositol 3-kinase regulates Ca^{2+} signaling in pancreatic acinar cells through inhibition of sarco (endo) plasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. Amer. J. Physiol. 287 : G1200—G1212.

Foster F. M., Traer C. J., Abraham S. M., Fry M. J. 2003. The phosphoinositide (PI)3-kinase family. J. Cell Sci. 116 : 3037—3040.

Gamper N., Reznikov V., Yamada Y., Yang J., Shapiro M. S. 2004. Phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate signals underlie receptor-specific $G_{q/11}$ -mediated modulation of N-type Ca^{2+} channels. J. Neurosci. 24 : 10 980—10 992.

Gasman S., Chasserot-Golaz S., Hubert P., Aunis D., Bader M. F. 1998. Identification of a potential effector pathway for the trimeric G_0 protein associated with secretory granules. G_0 stimulates a granule-bound phosphatidylinositol 4-kinase by activating Rho A in chromaffin cells. J. Biol. Chem. 273 : 16 913—16 920.

Grynkiewicz G., Poenie M., Tsien R. Y. 1985. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. J. Biol. Chem. 260 : 3440—3450.

Hartwig J. H., Kung S., Kovacsics T., Janmey P. A., Cantley L. C., Stossel T. P., Toker A. 1996. D3 phosphoinositides and outsi-

de-in integrin signaling by glycoprotein IIb—IIIa mediate platelet actin assembly and filopodial extension induced by phorbol 12-myristate 13-acetate. J. Biol. Chem. 271 : 32 986—32 993.

Hilgemann D. W., Feng S., Nasuhoglu C. 2001. The complex and intriguing lives of PIP₂ with ion channels and transporters. Science STKE. 111 : RE19.

Hsu A.-L., Ching T.-T., Sen G., Wang D.-S., Bondada S., Authi K. S., Chen C.-S. 2000. Novel function of phosphoinositide 3-kinase in T cell Ca^{2+} signaling. J. Biol. Chem. 275 : 16 242—16 250.

Ito N., Yakomizo T., Sasaki T., Kurosu H., Penninger J., Kanaho Y., Katada T., Hanaoike K., Shimizu T. 2002. Requirement of phosphatidylinositol 3-kinase activation and calcium influx for leukotriene B₄-induced enzyme release. J. Biol. Chem. 277 : 44 898—44 904.

Janmey P. A. 1994. Phosphoinositides and calcium as regulators of cellular actin assembly and disassembly. Annu. Rev. Physiol. 56 : 169—191.

Jenner S., Farndale R. W., Sage S. O. 1996. Wortmannin inhibits store-mediated calcium entry and protein tyrosine phosphorylation in human platelets. FEBS Lett. 381 : 249—251.

Kansra V., Groves Ch., Gutierrez-Ramos J. C., Polakiewicz R. D. 2001. Phosphatidylinositol 3-kinase-dependent extracellular calcium influx is essential for CX₃CR1-mediated activation of the mitogen-activated protein kinase cascade. J. Biol. Chem. 276 : 31 831—31 838.

Kawanabe Y., Hashimoto N., Masaki T. 2002. Effects of phosphoinositide 3-kinase on the endothelin-1-induced activation of voltage-independent Ca^{2+} channels and mitogenesis in Chinese hamster ovary cells stably expressing endothelin_A receptor. Mol. Pharmacol. 62 : 745—761.

Le Blanc C., Mironneau C., Barbot C., Henaff M., Bondeva T., Wetzker R., Macrez N. 2004. Regulation of vascular L-type Ca^{2+} channels by phosphatidylinositol 3, 4, 5-trisphosphate. Circ. Res. 95 : 300—307.

Lee J., Cha S.-K., Sun T.-J., Huang Ch.-L. 2005. PIP₂ activates TRPV5 and releases its inhibition by intracellular Mg²⁺. J. Gen. Physiol. 126 : 439—451.

Li S. W., Westwick J., Poll C. T. 2002. Receptor-operated Ca^{2+} influx channels in leukocytes: a therapeutic target? Trends Pharmacol. Sci. 23 : 63—70.

Liu D., Liman E. R. 2003. Intracellular Ca^{2+} and the phospholipid PIP₂ regulate the taste transduction ion channel TRPM5. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 100 : 15 160—15 165.

Liu B., Qin F. 2005. Functional control of cold- and menthol-sensitive TRPM8 ion channels by phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate. J. Neurosci. 25 : 1674—1681.

Lu Z., Jiang Y.-P., Ballow L. M., Cohen I. S., Lin R. Z. 2005. G_{αq} inhibits cardiac L-type Ca^{2+} channels through phosphatidylinositol 3-kinase. J. Biol. Chem. 280 : 40 347—40 354.

Ma A. D., Abrams C. S. 1999. Pleckstrin homology domains and phospholipid-induced cytoskeletal reorganization. Thrombosis and Haemostasis. 82 : 399—406.

Macrez N., Mironneau C., Carricaburu V., Quignard J. F., Babich A., Czupalla C., Nurnberg B., Mironneau J. 2001. Phosphoinositide 3-kinase isoforms selectively couple receptors to vascular L-type Ca^{2+} channels. Circ. Res. 89 : 692—699.

McLaughlin S., Wang J., Gambhir A., Murray D. 2002. PIP₂ and proteins: interactions, organization, and information flow. Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 31 : 151—175.

Miller Y. I., Worrall D. S., Funk C. D., Feramisco J. R., Witztum J. L. 2003. Actin polymerization in macrophages in response to oxidized LDL and apoptotic cells: role of 12/15-lipoxygenase and phosphoinositide 3-kinase. Mol. Biol. Cell. 14 : 4196—4206.

Nakanishi S., Catt K. J., Balla T. 1995. A wortmannin-sensitive phosphatidylinositol 4-kinase that regulates hormone-sensitive pools of inositolphospholipids. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 92 : 5317—5321.

Nilius B. 2003. From TRPs to SOCs, CCEs, and CRACs: consensus and controversies. Cell Calcium. 33 : 293—298.

Nilius B., Mahieu F., Prenen J., Janssens A., Owsianik G., Vennekens R., Voets T. 2006. The Ca^{2+} -activated cation channel TRPM4 is regulated by phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate. EMBO J. 25 : 467—478.

- Parekh A. B., Putney J. W. 2005. Store-operated calcium channels. *Physiol. Rev.* 85 : 757—810.
- Patterson R. L., Van Rossum D. B., Gill D. L. 1999. Store-operated Ca^{2+} entry: evidence for a secretion-like coupling model. *Cell* 98 : 487—499.
- Pedersen S. F., Owsianik G., Nilius B. 2005. Trp channels: an overview. *Cell Calcium*. 38 : 233—252.
- Prescott E. D., Julius D. 2003. A modular PIP_2 binding site as a determinant of capsaicin receptor sensitivity. *Science*. 300 : 1284—1288.
- Putney J. W. 1990. Capacitative calcium entry revisited. *Cell Calcium*. 11 : 611—624.
- Putney J. W., Broad L. M., Braun F.-J., Lievreumont J.-P., Bird G. St. J. 2001. Mechanisms of capacitative Ca^{2+} entry. *J. Cell Sci.* 114 : 2223—2229.
- Quignard J. F., Mironneau J., Carricaburu V., Fournier B., Babich A., Nurnberg B., Mironneau C., Macrez N. 2001. Phosphoinositide 3-kinase gamma mediates angiotensin II-induced stimulation of L-type calcium channels in vascular myocytes. *J. Biol. Chem.* 276 : 32 545—32 551.
- Rameh L. E., Cantley L. C. 1999. The role of phosphoinositide 3-kinase lipid products in cell function. *J. Biol. Chem.* 274 : 8347—8350.
- Rohacs T., Lopes C. M., Michailidis I., Logothetis D. E. 2005. $\text{PI}(4, 5)\text{P}(2)$ regulates the activation and desensitization of TRPM8 channels through the TRP domain. *Nat. Neurosci.* 8 : 626—634.
- Rosado J. A., Sage S. O. 2000a. Phosphoinositides are required for store-mediated calcium entry in human platelets. *J. Biol. Chem.* 275 : 9110—9113.
- Rosado J. A., Sage S. O. 2000b. The actin cytoskeleton in store-operated Ca^{2+} entry. *J. Physiol.* 526 : 221—229.
- Roth M. G. 2004. Phosphoinositides in constitutive membrane traffic. *Physiol. Rev.* 84 : 699—730.
- Runnels L. W., Yue L., Clapham D. E. 2002. The TRPM7 channel is inactivated by PIP_2 hydrolysis. *Nat. Cell Biol.* 4 : 329—336.
- Sakai K., Suzuki H., Oda H., Akaike T., Azuma Y., Murakami T., Sugi K., Ito T., Ichinose H., Koyasu S., Shirai M. 2006. Phosphoinositide 3-kinase in nitric oxide synthesis in macrophage. *J. Biol. Chem.* 281 : 17 736—17 742.
- Steinberg S. F. 2001. PI3King the L-type calcium channel activation mechanism. *Circ. Res.* 89 : 641—644.
- Stephens L., Ellson C., Hawkins P. 2002. Roles of PI3Ks in leukocyte chemotaxis and phagocytosis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14 : 203—213.
- Suh B. C., Hille B. 2005. Regulation of ion channels by phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate. *Curr. Opin. Neurobiol.* 15 : 370—378.
- Thastrup O., Dawson A. P., Scharff O., Foder B., Cullen P. J., Drobak B. K., Bjerrum P. J., Christensen S. B., Hanley M. R. 1989. Thapsigargin, a novel molecular probe for studying intracellular calcium release and storage. *Agents Actions*. 27 : 17—23.
- Tseng P.-H., Lin H.-P., Hu H., Wang Ch., Zhu M. X., Chen C.-S. 2004. The canonical transient receptor potential 6 channel as a putative phosphatidylinositol 3, 4, 5-trisphosphate-sensitive calcium entry system. *Biochemistry*. 43 : 11 701—11 708.
- Vanhaesebroeck B., Waterfield M. D. 1999. Signaling by distinct classes of phosphoinositide 3-kinases. *Exp. Cell Res.* 253 : 239—254.
- Viard P., Butcher A. J., Halet G., Davies A., Nurnberg B., Hebllich F., Dolphin A. 2004. PI3K promotes voltage-dependent calcium channel trafficking to the plasma membrane. *Nature Neurosci.* 7 : 939—946.
- Viard P., Exner T., Maier U., Mironneau J., Nurnberg B., Macrez N. 1999. $\text{G}_{\beta\gamma}$ dimers stimulate vascular L-type Ca^{2+} -channels via phosphoinositide 3-kinase. *FASEB J.* 13 : 685—694.
- Vlahos C. J., Matter W. F., Hui K. Y., Brown R. F. 1994. A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J. Biol. Chem.* 269 : 5241—5248.
- Walker E. H., Pacold M. E., Perisic O., Stephens L., Hawkins Ph. T., Wymann M.P., Williams R. L. 2000. Structural determinants of phosphoinositide 3-kinase inhibition by wortmannin, LY294002, quercetin, myricetin and staurosporine. *Mol. Cell.* 6 : 909—919.
- Wu L., Bauer C. S., Zhen X.-G., Xie Ch., Yang J. 2002. Dual regulation of voltage-gated calcium channels by $\text{PtdIns}(4, 5)\text{P}_2$. *Nature*. 419 : 947—952.
- Wymann M. P., Sozzani S., Altruda F., Mantovani A, Hirsch E. 2000. Lipids on the move: phosphoinositide 3-kinases in leukocyte function. *Trends Immunol. Today.* 21 : 260—264.
- Wymann M. P., Zvelebil M., Laffargue M. 2003. Phosphoinositide 3-kinase signaling — which way to target? *Trends Pharmacol. Sci.* 24 : 366—376.
- Zhang Z., Okawa H., Wang Y., Liman E. 2005. Phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate rescues TRPM4 channels from desensitization. *J. Biol. Chem.* 280 : 39 185—39 192.

Поступила 26 III 2007

THE EFFECT OF PHOSPHATIDYLINOSITOL KINASE INHIBITORS ON STORE-DEPENDENT Ca^{2+} -ENTRY IN MACROPHAGES

L. S. Kurilova, Z. I. Krutetskaya, O. E. Lebedev

Chair of Biophysics of St. Petersburg State University; e-mail: cozzy@mail.ru

Using Fura-2AM microfluorimetry the role of phosphatidylinositol kinases in the regulation of Ca^{2+} signals induced by purinergic agonist ATP and endoplasmic Ca^{2+} -ATPase inhibitor thapsigargin in rat peritoneal macrophages was investigated. It was shown that two structurally distinct phosphatidylinositol 3- and phosphatidylinositol-4-kinases inhibitors wortmannin and LY294002 showed a dose-dependent effect on store-dependent Ca^{2+} -entry, induced by thapsigargin or ATP. The data suggest that phosphatidylinositol 3- and phosphatidylinositol-4-kinases play an important role in the activation of store-dependent Ca^{2+} -entry in macrophages and that their effect might be mediated by their influence on actin cytoskeleton. The results are compatible with the «secretion-like coupling model» for store-dependent Ca^{2+} -entry in macrophages based on a reversible trafficking and coupling of the Ca^{2+} store with the plasma membrane which suggests the involvement of microfilaments and phosphatidylinositol kinases.

Key words: peritoneal macrophages, store-dependent Ca^{2+} -entry, phosphatidylinositol kinases, wortmannin, LY294002.